

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Acciones del peróxido de hidrógeno en conducción y automatismo cardiacos : estudios en corazón aislado de rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jean Marc Doucet

DIRECTOR:

José Ramón Ramón Giménez

Madrid, 2015

JEAN-MARC DOUCET

**ACCIONES DEL PEROXIDO DE HIDROGENO
EN LA CONDUCCION Y EL AUTOMATISMO
CARDIACOS. ESTUDIOS EN CORAZON
AISLADO DE RATA.**

**Director: Prof. Dr. JR RAMON
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE MEDICINA
Madrid, 1988**

IV

AGRADECIMIENTOS

Llegado a esta etapa de nuestro quehacer académico, es menester hacer una pausa para rendir muestras de gratitud a todos los que ofrecieron su ayuda y apoyo. Con todo, no se puede eludir la ingrata tarea de reducir la lista, no por olvido, más bien porque sería interminable.

Gracias ante todo a nuestro hermano y tutor Louis, quien mantuvo con peculiar celo la voluntad paterna de hacernos seguir la tradición familiar en el campo de la Medicina. A raíz de su visita en el año 1980, nos llenó de esperanzas al notificarnos la creación de una nueva Universidad en nuestra tierra natal Haití, " L'Université du Roi Henri Christophe ", siendo nuestro hermano el Fundador y Rector. A la vez, este acontecimiento reaviva el recuerdo del monarca Haitiano que impulsó las artes y la cultura durante su reinado (1811 - 1820). Todo nuestro esfuerzo se encauzó desde entonces hacia una colaboración futura, eficaz y fructuosa, en " L'Université du Roi Henri Christophe " .

Gracias a nuestro maestro, Prof. Dr. Pedro Zarco, Jefe del Departamento Central de Exploración Cardiopulmonar, quien una vez puesto al tanto del proyecto, nos aseguró su apoyo incondicional.

Gracias al Prof. Dr. Amador Schüller, entonces Mgfco. Rector de la Universidad Complutense, quien nos animó brindándonos su apoyo moral.

Gracias a nuestro maestro y Director, Prof. Dr. José Ramón Ramón, quien

V

pacientemente guió nuestros pasos por el arduo y gratificante camino de la -
Cardiología Experimental. Jamás se borrarán de nuestra mente sus palabras de
aliento este día del año 1982 cuando entramos por vez primera en el laboratorio
de Electrofisiología.

Gracias al Prof. Dr. Dieter Brandau, Jefe del Departamento de Cirugía
Experimental del Hospital Universitario de San Carlos, donde se llevaron a -
cabo estas investigaciones, por su deferencia, y a todo el personal.

Gracias al Dr. Miguel Arroyo, Jefe de la Sección de Extracción Atómi-
ca de los Laboratorios Centrales, quien mostró particular interés en propor-
cionarnos noticias bibliográficas de inestimable valor.

Nuestra gratitud a los Dres. J. Jara Arévalo y M^a Isabel Ambit, del De-
partamento Farmacéutico, por la amabilidad y paciencia que nos han prodigado
en la preparación y elaboración de los fármacos y sustancias utilizadas, ade-
más de atender cuantas consultas fueran necesarias.

Gracias al personal de los servicios técnicos, particularmente al Sr.
Emilio Maurelos del Servicio de Electromedicina.

Nuestra gratitud a la Dirección del Servicio de Informática y a todo-
el personal, particularmente a la Srta. Victoria Irala y Sr. Javier García
Aguado que no escatimaron esfuerzos y paciencia en la preparación del análi-
sis estadístico.

VI

Agradecemos sinceramente la labor secretarial de la Srta. M^a José Estévez que sacrificó incontables horas en leer el manuscrito.

Extendemos nuestra gratitud a los laboratorios Merck Sharp & Döhme y su delegado de área por la gentileza de facilitarnos interesantes noticias - bibliográficas.

Acabaremos agradeciendo el apoyo moral de la familia y pidiendo perdón al pequeño Joël que se vió privado de tantas horas de ocio y calor paterno.

VII

A la memoria de mi abuelo, Docteur
Décimus Doucet

A la memoria de mis padres, Louis
e Inés

A mis hijos

VIII

INDICE DE MATERIAS

Introducción

Generalidades	1
Radicales libres - Concepto	2
Implicaciones en la isquemia y reperfusión	8
Recuerdo anatómico del SEC	16
Cambios metabólicos y estructurales durante la IG y Rep	19
Arritmias en la isquemia y reperfusión (generalidades)	24

Justificación de la Tesis	46
----------------------------------	----

Material y Métodos

Material de trabajo	48
Protocolos	51
Criterios generales para la catalogación de las arritmias	64
Métodos estadísticos	65

Resultados

Acciones de H ₂ O ₂ perfundido aisladamente	67
Protocolos de isquemia global y reperfusión	86
Protocolos con DMSO y H ₂ O ₂	98
Protocolos con Manitol y H ₂ O ₂	119
Protocolos con Glucosa y H ₂ O ₂	137
Análisis de las arritmias desencadenadas	
Arritmias con H ₂ O ₂ perfundido aisladamente	143
Arritmias en la isquemia global y reperfusión	162
Arritmias en las series de DMSO y H ₂ O ₂	167
Arritmias en las series de Manitol y H ₂ O ₂	178
Arritmias en la serie de Glucosa y H ₂ O ₂	187

DISCUSION	193
------------------	-----

IX

[illegible]

X

ABREVIATURAS

A	Auriculograma
Ac	Acido
ACTP	Angioplastia coronaria transluminal percutánea
AGLP	Acidos grasos libres poliinsaturados
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	Adenosin trifosfato
AS	Arritmia sinusal
As	Asistolia
BAV	Bloqueo aurículoventricular
Bi	Bigeminismo
BS	Bradicardia sinusal
BSA	Bloqueo sinoauricular
C	Acompañado de
CAV	Conducción aurículoventricular
DAV	Disociación aurículoventricular
DIV	Disociación interventricular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Duración del potencial de acción
EA	Extrasístole auricular
EEF	Efectos electrofisiológicos
eH	Escape Hisiano
EV	Extrasístole ventricular
fa	Flutter auricular
fv	Flutter ventricular

XI

FVG	Fibrilación ventricular global
FVi	Fibrilación ventricular irreversible
Glu	Glucosa
IG	Isquemia global
Mani	Manitol
MDA	Malondialdehído
min	Minuto
ms	Milisegundos
PG	Prostaglandina / s
PM	Potencial de membrana
PR	Período refractario
PT	Potencial / es tardío / s
RA	Ritmo auricular
REn	Retículo endoplasmático
RE	Registro endocavitario
Rep	Reperusión
RIVA	Ritmo idioventricular acelerado
RMN	Resonancia magnética nuclear
RS	Ritmo sinusal
s	Segundo / s
SEC	Sistema específico de conducción
simul	Simultáneamente
SOD	Superóxidodismutasa
suce	Sucesivamente
TA	Taquicardia auricular
Tp	Torsade de pointes

XII

Tri	Trigeminismo
TS	Taquicardia sinusal
TU	Taquicardia de la unión
TV	Taquicardia ventricular
V	Ventriculograma

XIII

" Simplex Sigillum Veri "

INTRODUCCION

Cual fuere el origen de la vida sobre nuestro planeta, depende fundamentalmente del oxígeno. Pero este hecho acarrió unas consecuencias deletéreas.

Ha sido necesaria una larga evolución filogenética, puesto que el habitat y condicionantes primigenios se prestaban más bien a la respiración anaeróbica. En efecto, los organismos más primitivos capaces de realizar la fotosíntesis, fuente primordial del oxígeno atmosférico, las algas azul-verdosas hicieron su aparición hace aproximadamente dos mil millones de años. Pero fueron precedidas hace unos cuatro mil millones de años por formas mucho más simples, prácticamente moléculas, en una biosfera fundamentalmente reductora rica en hidrógeno (92,8%), metano, amoníaco. (1,2,3,4).

Entonces, la oxigenación de la atmósfera que pasa a ser oxidante como consecuencia de la "nueva adquisición", la fotosíntesis, supuso una pesada carga evolutiva para los múltiples y variados biota del sistema ecológico primitivo (4,5,6). El metabolismo oxidativo conlleva la formación de intermediarios tóxicos como son los radicales libres superóxido $O_2^{\cdot -}$, el radical hidróxilo OH^{\cdot} , el radical perhidroxilo HO_2^{\cdot} y sus precursores más directos que no son radicales libres propiamente dichos: el anión hidróxilo OH^- y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 . (5,6).

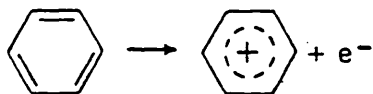
El conocimiento del radical superóxido y de las superóxido dismutasas, metalo enzimas encargadas de su destrucción, remonta a la década de los sesenta; mientras que hace ya más de un siglo desde que se comprobó la formación de H_2O_2 en las oxidaciones biológicas (5) y la existencia simultánea de peroxidasas, catalasas de los peroxisomas (6) como enzimas específicas para su degradación en agua y oxígeno molecular en el caso del último, y en agua y otros reductores en el caso de las peroxidasas.

Además, fue creciendo el interés de los investigadores desde que se apuntó hacia la xantino oxidasa (7,8,9) como enzima universal en la cadena de producción de radicales libres, implicados en la patogenia y fisiopatología de los daños celulares observados en el síndrome de la isquemia-reperfusión. Dejan constancia de ello los trabajos de Cantu (10) en el sistema nervioso central, Granger y col. (11) a nivel intestinal, Ward y col. (12) en la circulación renal y pulmones, Adkison (13) en el hígado, Hearse y col. (14) en el corazón, por citar unos pocos. La multiplicidad y variedad de aspectos ignorados deja patente la actualidad del tema que nos ocupa.

RADICALES LIBRES - Concepto

El enlace químico normal de una molécula está formado por una pareja de electrones con giro (spin) opuesto, y compartiendo la misma capa u orbital. Entendemos por radical libre cualquier átomo o molécula con un número impar de electrones en su capa más externa como resultante de la ruptura de un enlace covalente homopolar (por ejemplo por efecto

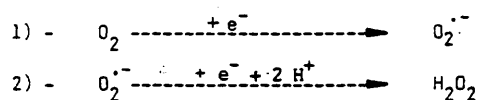
de rayos ultravioletas (uv) o cualquier radiación ionizante sobre enlaces C-H) formando así radicales libres electrónicamente neutros H^\bullet . El punto representa siempre el electrón libre. Por oxidación de una molécula orgánica como el benceno:



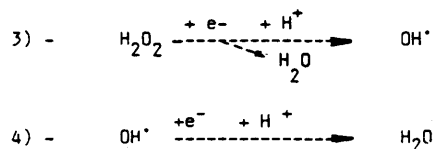
se forma un radical cargado positivamente (catión), mientras por reducción (ganando un electrón) derivan los radicales libres aniónicos (verbigracia el radical inorgánico superóxido $O_2^{\bullet -}$). Entonces, los radicales libres pueden ser orgánicos (la mayoría) e inorgánicos.

La presencia del número impar de electrones les confiere gran reactividad química, por la tendencia a captar o cederlos (buscando el equilibrio electrónico) iniciando reacciones en cadena donde intervienen en forma neutra o iónica. El contacto de un radical libre con cualquier molécula origina un nuevo radical libre, frenándose el proceso al chocar dos radicales libres entre sí (15,16,17,18).

En el organismo, el radical superóxido se origina a partir de la reducción monovalente del oxígeno, con la concomitante formación de H_2O_2 en una segunda reducción (ver reacciones 1 y 2):

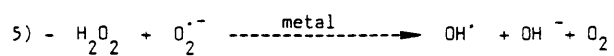


El peróxido a su vez se descompone en radical hidróxilo OH^\bullet que resulta ser más tóxico y lesivo para las células. Sin embargo, una peculiar adaptación evolutiva de los enzimas oxidantes facilita la desviación de la reducción del oxígeno hacia la vía tetravalente, con lo cual queda descartada la liberación de intermediarios tóxicos (ver reacciones 3 y 4):



Así pues la citocromooxidasa mitocondrial cataliza esta reducción tetravalente del 95% del O_2 utilizado por las células, transformándolo a H_2O , evitando así la activación de las fracciones superóxido y del H_2O_2 . (5,19).

Pero en presencia de xantino oxidasa, el radical $\text{O}_2^{\bullet -}$ puede combinarse con el H_2O_2 a través de la reacción de Haber-Weiss (20) necesitando un metal de transición (Fe ó Mn) como transportador de electrones (6) originándose el muy tóxico radical hidróxilo OH^\bullet . (6) (ver reacción 5)



El $O_2^{\cdot-}$ puede también protonizarse a radical neutro perhidroxilo HO_2^{\cdot} que atraviesa la doble capa lipídica con más facilidad y penetra en el citosol provocando daños irreversibles (6). El $O_2^{\cdot-}$ se comporta entonces como la base conjugada del ácido que es el radical HO_2^{\cdot} (5).

Hay que recalcar que estos metabolitos tóxicos se van eliminando mediante reacciones de dismutación espontánea pH dependientes, aunque muy lentamente (5). Además el organismo dispone de un buen arsenal de antioxidantes, siendo la ceruloplasmina plasmática el más potente conocido. También lo es la transferrina (21). Determinadas enzimas poseen también capacidad protectora contra oxidantes dañinos para nuestra economía. Las superóxido dismutasas (SOD) son verdaderos barredores de radicales libres, catalizando la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 que a su vez, mediante la intervención de la catalasa y glutatión peroxidasa, se transforma en agua y oxígeno molecular (5,21).

Empero a pesar de estas defensas naturales, permanece la amenaza de generarse radicales libres, y las vías son múltiples: por autooxidación de hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, tioles; y hasta la Hb y Mb liberan metabolitos oxigenados hiperactivos en su conversión a meta hemoglobina y meta mioglobina respectivamente (5). Es tanta la importancia del proceso en los eritrocitos, que poseen una meta-Hb reductasa para contrarrestar la reacción. También un buen número de enzimas conducen a la formación de radicales libres: como la aldehído oxidasa, la dihidro-orótico dehidrogenasa, la flavín-dehidrogenasa, la galactosa-oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, la monoaminoxidasa

(MAO), por citar unos pocos y la xantinaoxidasa, fuente principal de superóxido en los tejidos post-isquémicos y reperfundidos (7,8,9,22) entre otros el miocardio, objeto de nuestras investigaciones.

Otras fuentes conocidas de especies oxigenadas activadas son los neutrófilos, monocitos y macrófagos, eosinófilos, células endoteliales, peroxidación de ácidos grasos y las estructuras subcelulares como las mitocondrias, microsomas y retículo endoplasmático (REN) (23).

En condiciones fisiológicas, la ubicuidad de las superoxidodismutasas (SOD) hace sobresalir su papel de barrera defensiva (5,21). También resulta interesante recalcar que son un grupo de enzimas con características acordes a la adaptación filogenética ya mencionada. De ellas se conocen tres tipos diferentes pero cumpliendo idéntica función. Estructuralmente presentan uniones metálicas que participan activamente en el proceso catalítico sirviendo como receptor y dador de electrones. La Fe-SOD y Mn-SOD son específicas de los procariotas, mientras que la CuZn-SOD aislada de los eucariotas tiene secuencias de aminoácidos diferentes de las anteriores y parece haber evolucionado independientemente. Las bacterias en general contienen Fe-SOD y Mn-SOD con excepción del fotobacterium leiognati que contiene CuZn-SOD pudiéndoselo atribuir a su larga simbiosis con el pez huésped. Hay que subrayar que los eucariotas también poseen el Mn-SOD, localizado en las mitocondrias, y presenta curiosamente igual secuencia de aminoácidos que el Mn-SOD bacteriano, reforzando así la idea de que las mitocondrias evolucionaron en un principio independientemente como procariotas hasta llegar a la simbiosis

endocelular con los eucariotas (5). No dejaremos de mencionar otros aspectos peculiares de la biología de los radicales libres, como el incremento de la toxicidad de algunos antibióticos por el oxígeno, caso de la mitomicina, daunomicina; adriamicina entre otros. La SOD parece proteger contra estos efectos (5).

También se ha podido comprobar un claro ascenso de la letalidad de las radiaciones ionizantes en presencia del oxígeno, mediado por la liberación de metabolitos activados. El hecho quedó confirmado por la protección prestada por la SOD en cultivos de tejidos de mamíferos, suspensiones de bacterias e incluso ratones vivos, como han visto varios investigadores (24). La inyección de SOD hasta una hora después de la irradiación de los ratones ha conseguido reducir los efectos letales. Considerando la fugacidad de la vida media del radical superóxido - ($O_2^{\cdot-}$), (21) se supone que aparte de las fracciones libres producidas por las radiaciones, quedan activados los granulocitos como fuentes potenciales de radicales superóxido, manteniendo entonces el efecto lesivo durante un periodo más prolongado; siendo efectivo el bloqueo por SOD también en esta fase.

Finalmente, se asocia también los radicales libres a la flogosis. Por mediación de la quimiotaxis (25,26), los polimorfonucleares se acumulan en los focos infectados y lesionados, experimentando simultáneamente el incremento de su metabolismo para la realización de la fagocitosis, y eliminar las bacterias y detritus celulares, con producción de radicales oxigenados hiperactivos. Esos intermediarios en gran parte pasan al

tejido conectivo, depolimerizando el ácido hialurónico, exacerbando así el proceso inflamatorio en curso como ha observado Mc Cord (27). Por otra parte varios autores, entre ellos Salin (28) han comunicado un probable efecto antiflogístico de la SOD.

Ante este panorama, han ido surgiendo varios enfoques con la finalidad de contrarrestar los daños inducidos por las fracciones oxigenadas hiperactivas, quedando como momento óptimo para su liberación la reperusión y reoxigenación.

IMPLICACIONES EN LA ISQUEMIA Y REPERFUSION

La membrana de la célula miocárdica se compone de una doble capa de fosfolípidos con masas proteicas flotando en la matriz lipídica y atravesados por un poro central para los intercambios iónicos (29,30). Las moléculas lipídicas están dispuestas de tal forma que los polos lipofílicos de baja constante dieléctrica ocupan la parte intermedia entre los polos hidrofílicos de alta constante dieléctrica (29). Esta disposición del conjunto se puede equiparar a un circuito eléctrico compuesto por un condensador (papel desempeñado por los lípidos) y una resistencia representada por las masas proteicas, dispuestos en paralelo (31) (Fig. 1). El sistema está bañado en los líquidos intra y extracelular, soluciones salinas que también funcionan como dieléctrico (29). Otro componente estructural a destacar es el glicocáliz formando una capa externa recubriendo la membrana celular. Está constituido

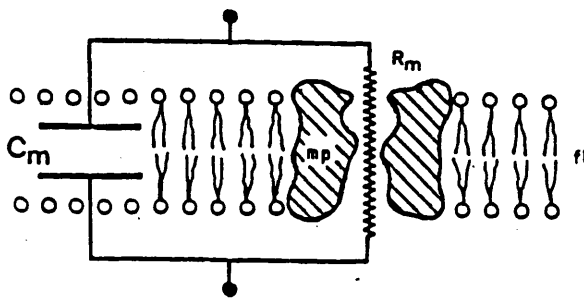


Fig.1. Equivalente eléctrico de la membrana celular y doble capa lipídica.
 C_m (capacitancia de la membrana), fl(fosfolípidos), mp (masa proteica con canal central). Este último elemento representa la resistencia de la membrana (R_m). (modificado de Coraboeuf, 31)

fundamentalmente por ácido siálico, mucoproteínas, glucoproteínas y oligosacáridos esterificados. Sirve a la célula miocárdica como depósito externo de calcio, elemento fundamental en el acoplamiento electromecánico (32,33).

La actividad rítmica del corazón se fundamenta en unos procesos electroquímicos caracterizados por un trasiego de iones pasivamente y electrogénicamente desde el medio extracelular al citosol y viceversa. Esta actividad eléctrica se registra en células aisladas mediante microelectrodos de vidrio obteniendo el potencial de acción (PA). También se obtiene la actividad global del corazón aislado perfundido parabióticamente inmerso en una solución electrolítica mediante electrodos extracelulares registrando el electrocardiograma convencional (ECG). (31).

El PA es la respuesta a un estímulo que puede ser de variable índole. Un PA efectivo depende del aumento de las corrientes iónicas "de entrada". Estos últimos fenómenos que ocurren espontáneamente en las células automáticas dependen de otros factores cuando se trata de la musculatura "banal" cardíaca. Se requiere entonces un estímulo inicial; aplicado mediante electroestimulación, o la propagación de un PA conducido desde zonas colindantes. Así, el potencial de membrana (PM) alcanza el "umbral" (-70mV) abriéndose los canales rápidos de Na^+ . La corriente de sodio (I_{Na^+}) resultante es responsable de la despolarización de las fibras miocárdicas (fase 0) del PA. Este estímulo, suficiente para llevar el potencial de membrana de -90 mV ó potencial de reposo hasta -70 mV produce una brusca inversión del potencial (29,31) hasta valores positivos (+30 mV).

Seguidamente se inicia la repolarización con un descenso precoz rápido (fase 1), sucediéndose un movimiento en meseta (fase 2) continuando la repolarización con una cinética más acelerada (fase 3) y completándose en la fase 4, manteniéndose estable el potencial transmembrana hasta que un nuevo estímulo pueda desencadenar una respuesta similar. A lo largo de estos procesos, intervienen intercambios iónicos a través de canales específicos y también mecanismos activos de transporte que no tenemos intención de analizar detalladamente. Este patrón varía para las células llamadas "marcapasos" naturales: nodo sinusal, células de la unión auriculo-ventricular, Purkinje; que gozan de automatismo, o capacidad intrínseca de activarse espontáneamente. Esta propiedad se manifiesta a nivel de la fase 4 con la llamada despolarización diastólica espontánea (DOE) (29,33,34,35). Se deduce de lo antedicho que la morfología del PA varía a lo largo del recorrido anatómico y según la topografía del sistema específico de conducción (SEC) del corazón (Fig. 2).

La aparición del PA depende de varios factores fundamentales, de tal manera que cualquier disturbio en estas premisas redundaría en la no aparición del PA. En un principio destacan ya la amplitud del impulso despolarizante y la velocidad de ascenso de la corriente (V_{max}). Se considera como causante del fenómeno, la activación e inactivación de los canales rápidos de Na^+ , tiempo y voltaje dependientes (36). Por otra parte, hay que subrayar que la disposición en doble capa de los lípidos de la membrana celular no es arbitraria. Experimentalmente se ha comprobado que la dispersión de lecitina y colesterol en medio

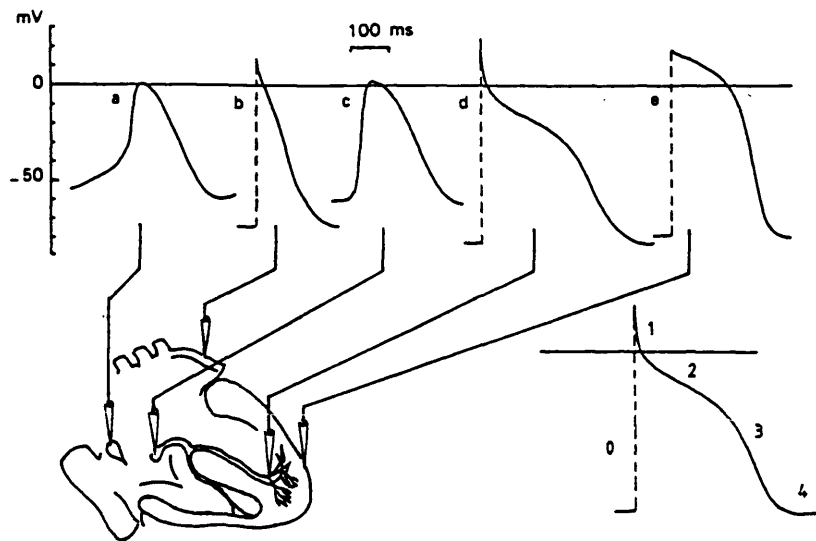


Fig.2. Morfología del PA según la topografía del SEC y diferentes zonas del corazón: a) nodo sinusal b) musculatura "banal" auricular c) nodo AV d) fibra de Purkinje e) musculatura "banal" ventricular. En el margen derecho abajo, se representa el PA de una fibra de Purkinje en reposo. Información más amplia en el texto. (Modificado de Coraboeuf,31)

acuoso adopta la configuración en doble capa. En presencia de lisolecitina (derivada de la acción de las fosfolipasas sobre los fosfolípidos de la membrana) se originan micelas, lo que condiciona la pérdida de la arquitectura de la doble capa con la consiguiente distorsión de los canales protéicos y trastornos en el trasiego de iones, amén de los disturbios electrofisiológicos específicos y arritmias provocadas por los metabolitos de degradación de los fosfátidos del sarcolema (circunstancias que se dan en la isquemia aguda) como se verá más adelante. La integridad de la membrana celular es de hecho condición "sine qua non" para la producción de los potenciales de reposo y PA. (37,38,39, 40).

En el proceso de la repolarización, intervienen entre otros factores decisivos la bomba de Na^+/K^+ (I_p), mediante el proceso de intercambio electrogénico de tres iones de Na^+ que salen del citosol, por dos de K^+ , con ganancia neta de cargas negativas por la célula y también la llamada corriente transitoria de salida (Ito) (35). El PA responde a la "ley del todo o nada". Con intensidades de estímulo por debajo del umbral, no se produce respuesta celular específica. En condiciones fisiológicas, sólo el PA conducido es efectivo. Por otra parte, además de producirse PA por estímulos eléctricos, también pueden aparecer por estimulación térmica o mecánica. A la vez, si fracasa el estímulo es posible la actividad espontánea de los cardiomiocitos por su propiedad intrínseca de automatismo (36).

La propagación de la excitación (Dromotropismo) depende de las propiedades pasivas de la membrana debido a su estructura, es decir,

su capacitancia y resistencia eléctrica. La capacitancia es la carga eléctrica que puede acumular la membrana para producir energía en la unidad de tiempo (28). De hecho, la excitación continúa cuando la corriente local es suficiente para descargar la membrana celular colindante. La resistencia del miocito engloba las impedancias de la membrana celular y la axial. Estos parámetros mantienen respectivamente una relación proporcional directa e inversa con la constante "de longitud" o λ (λ) que se define como la distancia a la cual el potencial de membrana se reduce a la tercera parte del voltaje medido en el punto de estimulación. A su vez, la corriente en el músculo cardíaco varía exponencialmente en función del tiempo, lo que permite definir la constante "de tiempo" como el tiempo requerido para que el voltaje decaiga a la tercera parte de su valor inicial (41). Otra propiedad pasiva de interés práctico es la refractariedad de la célula cardíaca mediante la cual se mantiene inexcitable después de un estímulo despolarizante, por un largo periodo que se calcula hasta 500 ms; esto es, la duración del PA, comparado con solo 1 ms en una fibra nerviosa. Entre las consecuencias más directas cabe reseñar la protección efectiva contra la tetanización, reentradas, y fibrilación ventricular en condiciones fisiológicas (42). La refractariedad puede estar influida también por la mayor duración del PA de las fibras de Purkinje respecto a la "musculatura de trabajo" colindante. Este hecho está probablemente relacionado con una corriente de Na^+ (corriente tardía de sodio) que persiste durante el plateau, demostrado por Carmeliet (43) entre otros investigadores en fibras de Purkinje de miocardio de conejo en el año 1984.

El Dromotropismo cardíaco se valora por la velocidad de conducción que a su vez ~~varia~~ con el tipo de fibras. Así pues, la musculatura "banal" auricular y ventricular presenta valores medios entre 0,3-1 m/s frente a 3-5 m/s de la red de Purkinje. La velocidad más lenta (0,02-0,1 m/s) la ostentan las células del nodo sinusal y auriculo-ventricular AV, explicando el freno fisiológico a la propagación de la excitación (29).

Los recientes trabajos experimentales de Spach y Dolber (44) demuestran que además de la pendiente de la fase 0 del PA (V_{max}), también influye la conducción anisotrópica en la velocidad de propagación del estímulo, concluyendo que la difusión de la excitación puede ser entre 3-10 veces superior en sentido longitudinal que transversal. Asocian su hallazgo a la distribución de la colágena interfibrilar.

El registro de la actividad eléctrica del corazón con electrodos alejados del órgano perfundido, da las ondas clásicas del ECG, que se considera como la derivada primera del PA desde los experimentos de Sanderson y Page (1883) (45). La nomenclatura original se debe a Einthoven que denominó la primera onda lenta de poca amplitud onda P, exponente de la despolarización auricular; le sigue un complejo rápido de gran voltaje con tres ondas designadas como QRS que representan la despolarización ventricular; y finalmente otra onda lenta representando la repolarización ventricular u onda T (42,45).

Con la finalidad de obtener el análisis secuencial más detallado

del frente de activación, Puech (1957) (46) consiguió por vez primera el registro del potencial del haz de His en el hombre. Posteriormente Scherlag, fundamentándose en estudios experimentales, fue el introductor de la electrofisiología clínica en el año 1969 (47,48).

RECUERDO ANATOMICO DEL SEC

Esbozaremos brevemente la anatomía del SEC siendo la primera estructura a destacar el nódulo sinusal de Keith y Flack, descrita en 1907. Está situado a nivel del "sulcus terminalis" en la unión de la vena cava superior con la aurícula derecha. Tiene una forma de coma o elipse alargada y constituida por las llamadas "células P". Unido por los haces internodales (puestos de manifiesto mediante estudios electrofisiológicos, aunque no tanto desde el punto de vista anatómico) encontramos más caudal el nódulo auriculoventricular de Aschöff-Tawara, descubierto por la misma época. Es una estructura triangular localizada en la base del tabique interauricular y cabalgando sobre el septo interventricular. Ocupa el vértice del triángulo de Koch, delimitado por el tendón de Todaro y el anillo de la válvula tricúspide. Encontramos una topografía superponible en la rata (49), lo que facilita el registro de los electrogramas intracavitarios abordando el anillo valvular a través de la aurícula derecha.

El nodo AV, rico en células transicionales sigue con la "pars penetrante" o fascículo común de His. Este último a nivel del septum

interventricular se divide en abanico en tres ramas demostrables desde los estudios originales de Tawara (1906), que son la rama derecha y la izquierda con su subdivisión anterior. A nivel de la masa miocárdica, estas fibras se distribuyen en la arborización terminal de Purkinje cuyas células tienen características histológicas muy similares a la "musculatura de trabajo" del corazón (49).

Lo más llamativo del nodo AV y haz de His en la rata es la riqueza en células nerviosas distribuidas entre las fibras específicas de conducción. Este hecho quedó ampliamente demostrado desde los estudios ultraestructurales de Mochet y Col. (1975) que individualizaron células nodales y transicionales en el nodo AV entremezclados con nervios adrenérgicos y colinérgicos. Pero hay predominio de neuronas colinérgicas en las fibras de conducción ventricular (49).

Los electrogramas obtenidos mediante un electrodo intracavitario colocado en la vecindad de la válvula tricúspide coinciden con las ondas del ECG convencional, y con igual significado, diferenciándose por el registro de la progresión del frente de activación en el miocardio y sistema específico de conducción, mediante deflecciones rápidas polifásicas; aunque fundamentalmente se recoge la actividad eléctrica del corazón derecho. En primer lugar se registra el electrograma auricular (A) seguido de la señal ventricular (V) y entre ellos se localiza la espiga del haz de His (H), conociendo al conjunto como hisiograma (Fig. 3). Se describirá la técnica más detalladamente en apartados posteriores.

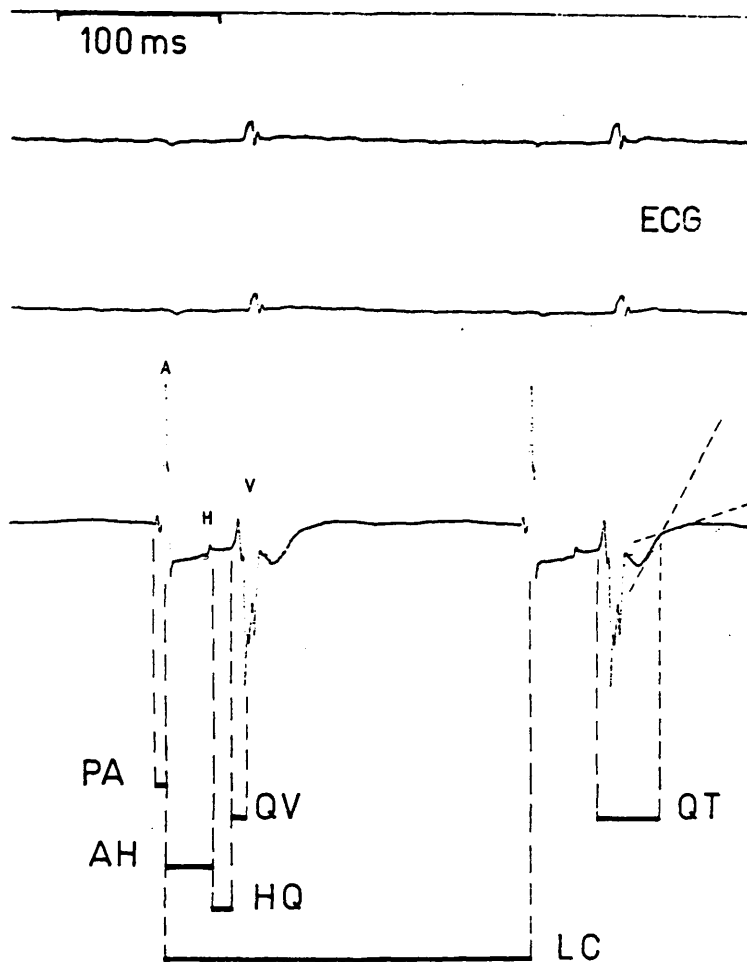
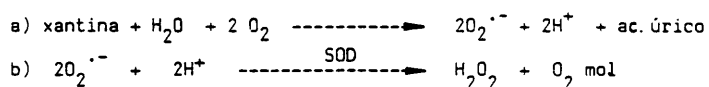


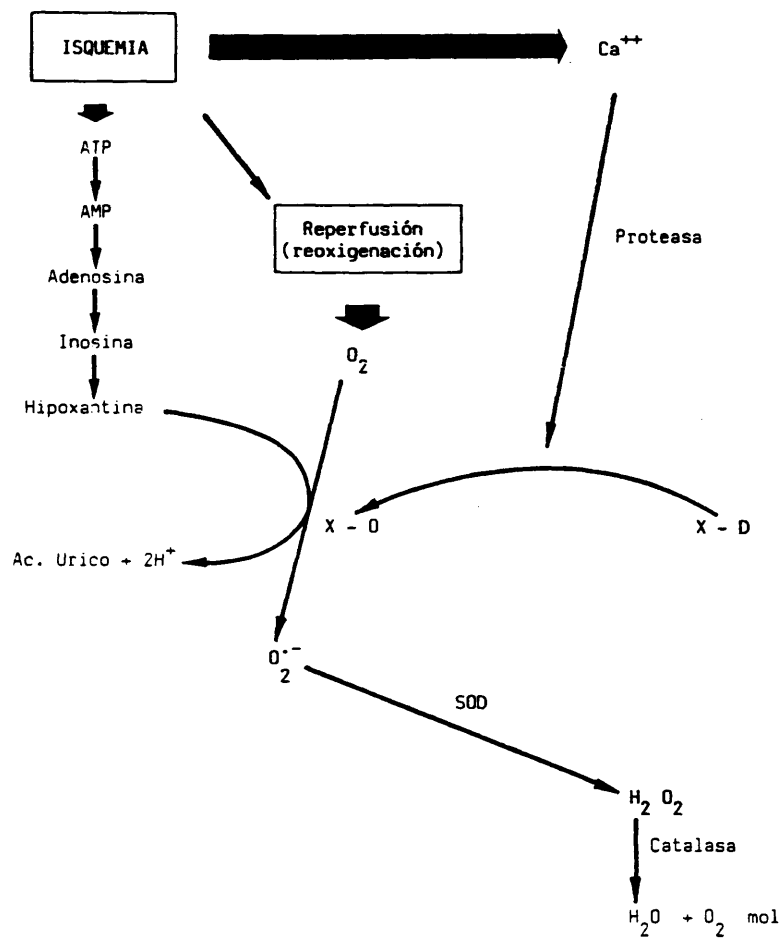
Fig.3. Electrocardiograma de superficie y endocavitario obtenidos simultáneamente en el corazón aislado de rata. ECG: onda P, complejo QRS, onda T. Registro endocavitario: A (deflexión auricular), H (espiga del haz de His), V (ventriculograma) y los intervalos correspondientes; PA, AH, HQ, QV. Velocidad del papel de registro: 250 mm/s. (Para más información ver texto)

CAMBIOS METABOLICOS Y ESTRUCTURALES DURANTE LA ISQUEMIA Y REPERFUSION

Tanto durante la isquemia o hipoxia tisular, tiene lugar un descenso de la reserva energética con desdoblamiento del ATP hasta hipoxantina. Simultáneamente hay una entrada masiva de Ca^{2+} en la célula activando una proteasa que conlleva a la transformación de xantina-Dehidrogenasa (X-D) a xantina-Oxidasa (X-O), catalizando este último la formación de xantina a partir del substrato hipoxantina (Cuadro 1). Esta brusca elevación del calcio intracelular es causa primaria de daños tisulares irreversibles a través de varios mecanismos potenciales entre los cuales citamos: el desacoplamiento de la fosforilización oxidativa mitocondrial, activación de ATP-ases tisulares calcio dependientes, activación de fosfolipasas y proteasas, inhibición de la bomba de Na^+ (18). Con la reperfusión y llegada masiva de oxígeno, se comprueba un comportamiento peculiar "la paradoja del oxígeno" (14) podríamos decir por analogía a la "paradoja del calcio" (50,51,52). La xantina oxidasa formada durante la fase de isquemia transporta un electrón al oxígeno molecular reduciéndolo a radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, originándose también peróxido de hidrógeno según la secuencia:

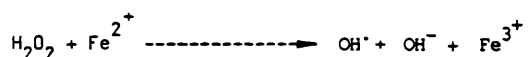


A partir de esta fase se origina el radical hidroxilo OH^{\cdot} siguiendo



Cuadro-1 Mecanismo propuesto para la formación de radicales libres derivados del oxígeno en el síndrome de isquemia-reperfusión y defensas disponibles. (Modificado de Mc Cord, 18).

la reacción de Fenton (6) interviniendo el sistema hierro ferroso-férrico como transportador de electrones:



Recordemos que el poder oxidante y lesivo del radical hidroxilo es muy superior a sus precursores H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$, quedando entonces insuficientes las defensas naturales aportadas por la SOD, catalasa y glutathion peroxidasa (17,18). Con estas fracciones activas liberadas, quedan alcanzables prácticamente todos los componentes celulares; especialmente los amino ácidos portadores del grupo sulfihidrilo (cistina, metionina) y los ácidos grasos poliinsaturados de la pared celular. La activación de la fosfolipasa A desencadena la cadena del ácido araquidónico con formación de endoperóxidos cíclicos, prostaglandinas (PGs) G_2 y H_2 (16,39). Queda inhibida la síntesis de prostaciclina (PGI_2) con lo cual predominan los efectos del tromboxano A_2 (53). La fosfolipasa C al romper la unión entre el fosfato y glicerol contribuye a la desestructuración de la doble capa lipídica con la aparición de los lisofosfátidos. Al respecto es menester recordar el papel fundamental desempeñado por los fosfolípidos para el normal desarrollo de los mecanismos activos de la membrana: sistema Na^+/K^+ adenosintrifosfatasa y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ATPasa (39). Rao y Patrick (54) han demostrado también tras producir infarto de miocardio en la rata, alteraciones en la composición de los ácidos grasos libres poliinsaturados (AGLP) de la membrana, aumento de peroxidación lipídica y cambios en la fluidez de la doble capa. Estos cambios se asociaron también con reducción del ácido araquidónico, ácido eicosapen-

tanoico, glutathion peroxidasa y compuestos con grupos sulfhidrilos (reconocidos antioxidantes). Entre otras observaciones, concluyen que el incremento de ácido linoléico "competidor" de la ciclooxigenasa frente al ácido araquidónico, puede reducir la síntesis de prostaglandinas. Los daños potenciales también incluyen desnaturalización proteica, rotura de la cadena del DNA (18), generación de factores quimiotácticos con el consiguiente acúmulo de polimorfonucleares (también capaces de producir radicales libres), e inhibición de la síntesis de colágena. Los disturbios de la contractilidad miocárdica "stunned myocardium" observados en el periodo post-isquémico (55,56) se han querido asociar a los neutrófilos y radicales libres (57). Engler (58) y cols. han demostrado esta relación elegantemente, perfundiendo corazones de perros anestesiados con soluciones exentas de neutrófilos (perfusión agranulocítica), con un número reducido de células (perfusión granulocitopénica) y con el sistema perfusor repleto de polimorfonucleares. En las últimas condiciones, aparecieron claros trastornos de la función ventricular, ausentes en la agranulocitopenia. Otros investigadores llegaron a resultados similares induciendo neutropenia farmacológicamente (59,60).

La peroxidación de los lípidos de la membrana, unido a los factores citados conlleva a trastornos de la permeabilidad. De aquí se origina el desequilibrio iónico, una de las posibles causas de las arritmias severas que acompañan a la reperfusión. Por otra parte, está comprobado que la mayor riqueza en xantina oxidasa está a nivel del endotelio vascular (61). Entonces el daño primario tiene lugar a este nivel y explica el edema intersticial, con posterior entorpecimiento de la circulación miocárdica y daño celular irreversible.

Desde hace varias décadas, investigadores pioneros han comprobado la formación de edema intersticial en el corazón de ratas sometidas a anoxia. Lemley y Meneeley (62) utilizando Na^{24} han presentado resultados significativos respecto a la retención de agua por el músculo esquelético en condiciones similares. Kuprianov (63) aportó ya imágenes ultraestructurales de microscopía electrónica demostrando además del edema tisular, lesión del endotelio vascular y membrana basal de los capilares del miocardio de la rata, después de ligar vasos coronarios.

Los AGLP también producen daños importantes a este nivel (64). Más recientemente (1987) Hülsmann y Dubelaar (65) Sunnergren y Rovetto (66) llegaron a conclusiones similares. Los primeros insisten en que el efecto de la X-O se realiza extracelularmente al lesionarse el endotelio vascular, siendo el primer punto a sufrir de las consecuencias deletéreas de la reperfusión. Efectivamente, con la reperfusión hay un incremento de la congestión tisular sufriendo las células un verdadero proceso edematoso debido probablemente a la depresión de la bomba de Na^+/K^+ en el sarcolema, incremento de la permeabilidad, o formación de fracciones intracelulares osmóticamente activas. (67). La participación del sarcolema en la producción del edema celular quedó documentada por Frame y cols. (68) mediante fragmentos de anticuerpos antimiocárdicos miosina (Fab'2) marcados.

Se han ido desarrollando métodos directos e indirectos para detectar el efecto de los radicales libres y peroxidación lipídica. La literatura al respecto es abundante y los resultados prometedores. Se pensó en

la determinación del malondialdehído (MDA) como metabolito de peroxidación de los AGLP (69,70). El bloqueo de la xantina-oxidasa, enzima tan relevante en la cadena de producción de especies activas derivadas del oxígeno, también se planteó mediante la administración de Alopurinol (71,72). La utilización de conocidos barredores de radicales libres, asociados o no a los enzimas catalasa y/o glutatión peroxidasa, lleva a la evidencia indirecta de su presencia: verbigracia el Dimetil sulfóxido (DMSO) reconocido captador de radicales OH^{\bullet} (73), SOD y catalasa (74, 75, 57, 76), Manitol también descrito como barredor de OH^{\bullet} (77,78,79). Estamos ya en la moderna fase de rastreo directo de radicales libres mediante la resonancia magnética nuclear (RMN) "spin resonance" (80,81,16). Algunas de estas sustancias se plantean ya como promesas terapéuticas (82-a, 82-b).

ARRITMIAS EN LA ISQUEMIA Y REPERFUSION

Los disturbios del ritmo cardiaco en general se producen por varios mecanismos. Independientemente de las circunstancias de la isquemia y reperfusión, se pueden clasificar desde dos puntos de vista: Considerando sus manifestaciones clínicas o según los mecanismos electrofisiológicos responsables.

Clasificación general de las arritmias cardíacas.-

I.- CLINICA

1.-Ritmos rápidos

- a) Flutter (auricular o ventricular)
- b) Fibrilación (auricular o ventricular)

2.- Ritmos lentos

- a) Bradicardias y bloqueos A-V
- b) Escapes

II.- ELECTROFISIOLOGICA

A.- Unicelulares

A-1.- Trastornos del automatismo

1º. Mecanismos fisiológicos

- a) Aceleración
- b) Enlentecimiento

2º. Patológicos

- a) Oscilaciones a potenciales igual
a -75 mV. (PTs).
- b) Oscilaciones a nivel "plateau".
Automatismo anómalo.

B.- Pluricelulares

B-1.- Trastornos de la conducción

- a) Bloqueos:
 - 1º Grado
 - 2º Grado
 - 3º Grado
- b) Descoplamiento eléctrico inter-
celular.

B-2.- Trastornos de la conducción y/o de la re-
polarización.

- c) Reentradas
 - 1º Macro-reentradas.

2º Micro-reentradas.

8-3.- Trastornos de la conducción y automatismo y/o repolarización (mixtos).

d) Enlentecimiento de la conducción
(parasistolia)

e) Aceleración de la conducción
(preexcitación).

(Ramón, comunicación personal).

El diagnóstico electrocardiográfico de flutter o fibrilación auricular se realiza por las llamadas "ondas F" en diente de sierra del flutter, y las "ondas f" de fibrilación. Se mantiene la línea isoelectrica en el primer caso, mientras desaparece en la fibrilación auricular pura. Estos ritmos ectópicos se diferencian además por la frecuencia de descarga auricular: entre 220-350 L/m en el caso del flutter, y siendo superior a 350 (hasta 650 L/m) durante la fibrilación auricular. El freno fisiológico a nivel del nodo AV regula la frecuencia ventricular (por lo común arritmico en ambas circunstancias) manteniéndose alrededor de 150-200 L/m antes de iniciar terapia antiarritmica específica.(83-1)

La FV se caracteriza por la actividad eléctrica caótica que se recoge en el ECG, no pudiendo definir las conocidas ondas clásicas P-QRS-T. Puede adoptar la configuración de ondulaciones gruesas o finas. Clínicamente, la FV no tratada es letal (83-1).

Las bradicardias y bloqueos AV se caracterizan por mantenerse la actividad sinusal. La frecuencia cardíaca suele ser inferior a los 60 L/m, y en presencia de bloqueo AV completo, depende de ritmos subsidia-

rios (nodales o ventriculares) pudiendo entonces no superar los 15-40 L/m. (83-1).

Electrofisiológicamente, los trastornos del automatismo pueden observarse en preparaciones de fibra de Purkinje aislado reduciendo el K^+ o aumentando el pCO_2 local (31), encuadrándose aquí la actividad - desencadenada y potenciales tardíos (PT).

Los trastornos de la conducción tipo reentrada se pueden reproducir también experimentalmente en haces de células de Purkinje en presencia de un medio enriquecido en K^+ y catecolaminas. Estas condiciones llevan a enlentecimiento de la conducción por un incremento de la conductancia al calcio ($g Ca^{2+}$) en fibras parcialmente despolarizadas (31). Aparte de las macro-reentradas, también se puede observar el fenómeno en circuitos reducidos (45), no sobrepasando 1 mm , y estableciéndose a nivel de la unión Purkinje-músculo (83-2).

Finalmente, los disturbios complejos del ritmo se deben a la concurrencia simultánea de varios de los mecanismos ya mencionados. La parasistolia se caracteriza por la actividad concomitante del nodo sinusal o cualquier foco auricular con una zona aislada del miocardio ventricular presentando bloqueo de entrada y salida. Descarga a su ritmo propio despolarizando el miocardio colindante cuando se encuentra excitable. A su vez, el foco parasistólico puede ser ocasionalmente despolarizado por un latido sinusal. La consecuencia directa, es un foco de descarga

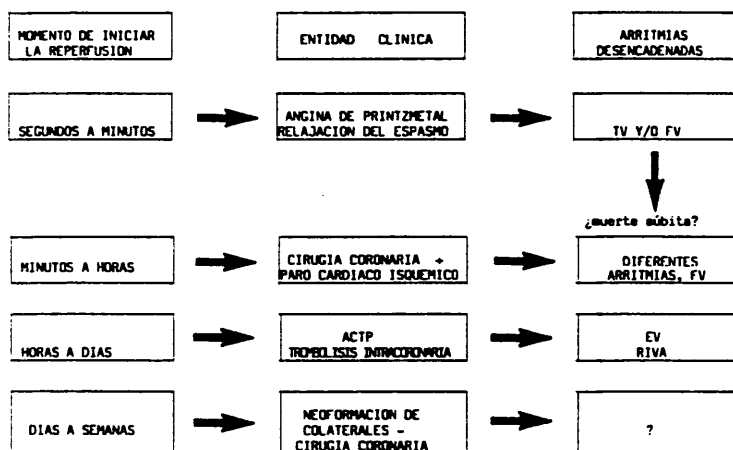
a un ritmo lento y acoplamiento variable con el ritmo de base, presentando la característica de ser los ciclos interectópicos más largos múltiplo de los más cortos. El foco parasistólico puede estar ubicado en el miocardio auricular o cualquier punto del SEC. (83-1).

La preexcitación se caracteriza por la existencia de un haz anómalo que establece un cortocircuito entre el miocardio auricular y ventricular, ignorando entonces el nodo AV. Es el ejemplo genuino de un latido de fusión reconociéndose electrocardiográficamente por la onda delta. Está comprobado que este circuito puede dar también origen a arritmias reciprocantes por reentrada. (45, 83-1, 83-2).

Estos mismos mecanismos electrofisiológicos y otros factores se barajan para explicar el origen de las arritmias vistas en el modelo de isquemia - reperusión que nos ocupa. Hay que decir ya que estas mismas condiciones se reúnen en clínica humana en los cuadros de espasmo coronario con posterior recuperación del riego miocárdico (84), establecimiento de circulación colateral después de un accidente isquémico, cortocircuitos aorto-coronarios quirúrgicos posteriormente a un infarto de miocardio, la trombolisis intracoronaria y la muy moderna angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP). Como viene esquematizado en el cuadro 2, modificado de Manning y Hearse (85), se quiere resaltar la influencia del tiempo de isquemia sobre las arritmias desencadenadas durante la reperusión, teniendo como mayor exponente la FV.

La incidencia de las arritmias por reperusión en las citadas

CUADRO 2 - IMPORTANCIA CLINICA DE LA ISQUEMIA Y REPERFUSION



Modificado de Manning y Hearse

situaciones clínicas, incluido los episodios de ritmo idioventricular acelerado (RIVA) que siguen a la recanalización de una arteria coronaria mediante trombolisis o ACTP, ha sido corroborado por varios equipos de investigadores. (84,86,87). En el campo experimental, Tennant y Wiggers (88) quedarán con el mérito histórico de haber sido los primeros en observar FV (utilizando un miógrafo provisto de un sistema óptico) mediante la ligadura y posterior liberación de las arterias coronarias.

Antes de analizar más detalladamente los mecanismos involucrados en las arritmias por reperfusión, hay que subrayar primero los cambios surgidos durante el período isquémico (89,90) como son: 1) Reducción de la duración del potencial de acción (DPA) tiempo dependiente 2) Disminución de la amplitud o voltaje del PA 3) Reducción del potencial transmembrana de reposo haciéndose más positivo 4) Enlentecimiento de la velocidad de ascenso de la fase 0 (V_{max}). Es de gran interés recalcar que estos cambios muestran heterogeneidad tanto temporal como espacial. Esta peculiar situación electrofisiológica parece empeorar con la reperfusión. Aunque se ha descrito cierta recuperación del voltaje del ECG durante los primeros minutos de la reperfusión (91,92), la sincronización de la despolarización puede requerir varios minutos. Por otra parte, otros parámetros sufren un mayor deterioro con el restablecimiento del flujo coronario como por ejemplo el período refractario efectivo (PRE) que se acorta aún más, redundando en una mayor dispersión de la refractariedad entre zonas isquémicas y áreas ya recuperadas, lo que conlleva al aumento de la heterogeneidad eléctrica global del corazón. (93). Esta última condición existente entre zonas

lesionadas y recuperadas plantea las bases para la reentrada, según Russel (94). La heterogeneidad de la lesión celular y posterior recuperación tiene probablemente su origen en la misma disparidad entre el riego coronario y la actividad metabólica tanto en la misma zona de isquemia como entre ésta y las áreas colindantes no isquémicas. (94,95). En estas condiciones los cardiomiocitos sufren lesión irreversible y se necrosan, pero siguiendo un ritmo irregular a la vez que una marcada diferencia en el tiempo de aparición de dichas lesiones.

Algunos autores sugieren que la TV y la FV podrían desencadenarse como respuesta al retorno brusco de la actividad eléctrica a zonas previamente inexcitables. (89,90). Se habla del frente de activación avanzando lentamente en múltiples ondas por vías tortuosas entre islotes de zonas de bloqueo, y que pueden cambiar de localización y magnitud incesantemente; lo que a todas luces reúne los criterios para las reentradas. Downar, Janse y Durrer (89) señalaron con anterioridad que estas disritmias originadas localmente pueden en un principio iniciarse como microzonas de fibrilación hasta el desarrollo de FV global; opinión también compartida por Corr y Witkowsky (86). Más recientemente, Janse y cols. (96) mediante cartografía epicárdica y destrucción del endocardio con aplicación de fenol, han observado que durante la isquemia regional por ligadura de la arteria descendente anterior (DA) siguió el desencadenamiento de arritmias ventriculares. Determinaron que el mecanismo es por reentrada según el análisis de los circuitos isocronos. Pero mientras apreciaban FV genuina con la perfusión en corazones íntegros, el disturbio del ritmo visto en

las preparaciones sin endocardio no tenía la morfología de FV. Este hecho les llevó a plantearse si es imprescindible la presencia del subendocardio para la aparición de FV.

En experimentos anteriores (89) vieron que la isquemia conduce a cambios electrofisiológicos en el subepicardio (acortamiento de la DPA, reducción de su amplitud, del Vmax y del potencial de reposo) llegando a la situación de "refractoriedad postrepolarización" con respuesta 2:1, iniciándose FV con la reperfusión. Explican estos efectos últimos por la inhomogeneidad de la refractoriedad en las zonas colindantes "border zone" creando condiciones propicias para la reentrada. Bolli y cols. (97) habían observado cierta disparidad en el comportamiento del endocardio respecto al epicardio de corazón de perros sometidos a oclusión coronaria (DA), con claro gradiente del flujo sanguíneo (predomina a nivel subepicárdico). Esto podría explicar entonces el mayor grado de disfunción endocárdica. Los hallazgos de Hale y Kloner (98) están en concordancia con estos autores. Además, han demostrado que la rata tiene muy escasa circulación colateral, con tendencia a desarrollar más bien infarto transmural con la isquemia prolongada. Es interesante subrayar que siempre encontraron una delgada franja de endocardio sano en los corazones reperfundidos, sugiriendo que podría deberse a libre difusión de material energético desde la cavidad ventricular. Concluyen que el endocardio de la rata es más resistente a la isquemia.

Otro mecanismo alternativo, para el desencadenamiento de estas

arritmias de la reperfusión, puede ser por incremento del automatismo fisiológico. En la literatura se comenta la aparición de RIVA en el corazón del gato al restablecer el flujo coronario. Sheridan y cols. (99) atribuyen este hecho a la estimulación de receptores alfa -1 por catecolaminas liberadas durante la reperfusión. Efectivamente, este efecto puede relacionarse con el aumento de receptores alfa preconizado por Corr y cols. (100) durante la isquemia. La observación de RIVA en pacientes sometidos a trombolisis intracoronaria sostiene su relación con un aumento del automatismo (87).

Algunos autores se han planteado si existe diferencia entre las arritmias precoces observadas en la isquemia y durante los primeros minutos de la reperfusión. Estudios en la rata "in vivo" permitieron concluir que los mecanismos básicos son comunes (heterogeneidad de la repolarización celular y reentrada). Sin embargo se acepta que las arritmias por reperfusión son más severas, ocurriendo con más brusquedad siendo además previsibles (85).

No se ha dejado de insistir sobre la duración del período de isquemia previo a la reperfusión, considerandolo como el determinante mayor de la vulnerabilidad del miocardio a las arritmias por reperfusión. Efectivamente un grupo de investigadores (101) observó en el corazón aislado de rata perfundido con catecolaminas y sometido a isquemia por intervalos breves (1 a 3 minutos) ausencia de FV al restablecer la perfusión. Mientras con 10 minutos de isquemia (por ligadura coronaria) la incidencia de FV fue incrementando hasta alcanzar el 100% con 15

minutos de isquemia seguido de reperfusión. Insisten en que las arritmias se desencadenan en los primeros minutos de reiniciar el riego coronario. También hacen hincapié estos autores sobre el hecho de presentarse una reducción paulatina de los disturbios del ritmo conforme se alarga el periodo previo de isquemia más allá de los 15 minutos, llegando incluso a inhibirse casi totalmente a los 30 minutos. Esta clara disminución de la vulnerabilidad del miocardio no está aclarada totalmente aunque se podría relacionar con la presencia o ausencia de lesiones irreversibles (102). Esta misma observación se comprobó también en especies como el perro y cobaya (103,85,104). Quiere esto decir que las arritmias potencialmente letales de la reperfusión se dan solamente en tejidos viables después del periodo isquémico. Con lesiones celulares irreversibles, el restablecimiento del flujo miocárdico puede ser totalmente inocuo desde el punto de vista electrofisiológico (85). Estos conceptos se ven apoyados por estudios clínicos, llegando a afirmar que la aparición de arritmias severas durante la reperfusión puede ser marcador fiable de la recuperación del miocardio dañado parcialmente; o también recanalización certera durante trombolisis intracoronaria de las arterias obstruidas (86,87).

Recapitulando, queda entonces catalogado como determinante mayor de las arritmias por reperfusión, la duración de la isquemia previa; habiéndose observado un pico de vulnerabilidad pasados los 5 minutos de isquemia en la rata "in vivo" y más allá de los 15 minutos en el "corazón aislado de rata " y perfundido que se podría relacionar con el mismo concepto de lesión miocárdica irreversible según Hearse y

cols. (85).

Muchos otros factores se barajan en la literatura como por ejemplo las alteraciones del sarcolema. Daños en la integridad de la membrana celular conlleva disturbios en los intercambios iónicos (37,39,86). Además está comprobado que las alteraciones electrofisiológicas producidas por isquemia son más severas y diferentes de las observadas cuando se emplean técnicas de hipoxia (perfundiendo con Tyrode gaseado con Nitrógeno). (105). Durante la isquemia se produce retención de metabolitos tóxicos, acumulación de iones intra y extracelularmente con acidosis secundaria. (106). Concretamente hay retención de lactato miocárdico y en las venas locales, incremento de AMPc (107), acúmulo de CO_2 con aumento de la presión parcial tisular (108) hasta un promedio de 300 mm/Hg en un lapso de 7 segundos y sin gradiente con el contenido del seno coronario (109), K^+ o, Ca^{2+} i, Na^+ i y pérdida de Mg^{2+} (85). Concomitantemente hay incremento de lisofosfoglicéridos, acilcarnitinas de cadena larga, derivados de acil CoA, así como liberación de catecolaminas intramiocárdicas por las terminaciones adrenérgicas (110). A la vez se produce también depleción de ATP (86). Con la reperfusión, se produce un proceso de barrido y redistribución de los catabolitos formados durante la isquemia, que pueden directa o indirectamente modificar las permeabilidades iónicas previamente alteradas durante el periodo isquémico. Esto redunda en efectos sensibles en la conductancia a través del sarcolema, llevando a la ya citada heterogeneidad eléctrica y disritmias potencialmente letales (87,111).

En contraste, el lavado rápido del miocardio isquémico "in vivo" con suero salino gaseado con nitrógeno, restablece la amplitud de los potenciales de acción subepicárdicos en un lapso de 20 segundos (89), lo que equivaldría al lavado de los metabolitos tóxicos a pesar de mantenerse la hipoxia. Se da el corolario de crearse cambios electrofisiológicos isquémicos perfundiendo fibras miocárdicas aisladas con sangre venosa procedente de zonas isquémicas (112).

La depleción rápida de los depósitos celulares de ATP puede también modificar directamente las permeabilidades iónicas, aunque el papel desempeñado en las arritmias por reperfusión no sea primario. (95,113). Está comprobado por la mayoría de autores un incremento de K^+ o durante los primeros segundos de la isquemia. Parece reflejar una mantenida e importante extrusión de los cardiomiocitos, posiblemente debido a alteraciones del sistema Na^+-K^+ ATPasa del sarcolema, o cambios de la permeabilidad de la membrana celular al K^+ . (86,114). Quedó demostrado que los lisofosfoglicéridos acumulados en el miocardio isquémico (114) a la vez inhiben directamente al sistema Na^+-K^+ ATPasa, condicionando así la salida de K^+ de los eritrocitos sin mediación de hemólisis. (115). Por otra parte Gerlings y cols. (116) han comprobado que la infusión de catecolaminas en el corazón isquémico puede también producir un incremento de la salida del K^+ con concomitante ascenso de su concentración extracelular.

Interesantemente, se ha visto que en los primeros minutos de iniciar la reperfusión del miocardio, el K^+_o decae rápidamente a niveles

control. (117). El papel decisivo de esta inversión del gradiente de K^+ (que se realiza además de forma heterogénea) en la inducción de disritmias por reperfusión quedó demostrado de manera convincente al reducirse la incidencia de dichos disturbios del ritmo en corazón aislado de rata reperfundido con Tyrode enriquecido con K^+ (12 mM) comparado con reperfusión manteniendo el K^+ a niveles más bajos (3 a 4,5 mM). (118). En fecha reciente, Cook (1988) (119) nos ofrece un nuevo enfoque del mecanismo íntimo probablemente relacionado con este incremento del K^+_{o} durante la isquemia o anoxia, asociándolo a unos canales de K^+ --ATP dependientes similar a los existentes en las células beta del páncreas fundamentándose en unos hallazgos de Noma y cols. entre otros investigadores (citado por Cook). Estas compuertas estando cerradas en situaciones fisiológicas, se abrirían ante el ya mencionado descenso de ATP durante la isquemia (18) con la consiguiente salida masiva de K^+ al medio extracelular.

Ya comentábamos el aumento de la concentración local del CO_2 durante la isquemia miocárdica "in vivo" (109). La acidosis resultante aumenta el poder arritmogénico de los lisofosfoglicéridos y acil carnitinas de cadena larga acumulados durante la isquemia. (120). También la acidosis produce disminución de la conducción en las fibras de Purkinje como consecuencia de su despolarización, lo que facilita la aparición de ritmos ectópicos (121). Se ha podido comprobar que el descenso brusco del pCO_2 alveolar "in vivo", condiciona una incidencia alta de FV, situación que podría equipararse a las circunstancias de la reperfusión. (86,122). La alcalosis secundaria a la reducción brusca

de la carbonemia es potencialmente arritmogénica, por acentuarse la fase de despolarización diastólica tanto en fibras funcionando espontáneamente o activadas por estimulación eléctrica (123).

Durante la isquemia tiene lugar cierto aumento del Ca^{2+}_i (124). Con periodos isquémicos de 15 minutos seguidos de reperfusión, hay una entrada masiva de Ca^{2+} en la célula, aumentando concomitantemente el tono miocárdico basal (125,126,127). La intensa contractura mediada por el Ca^{2+} tanto en los tejidos isquémicos como reperfundidos, ha mantenido el interés de varios grupos de investigadores. Henderson (128) quiso establecer ya una diferencia entre la contractura por hipoxia que entiende como "rigor" relacionado con el balance energético; y la contractura por reoxigenación que se debería a acúmulo de Ca^{2+} citosólico. Varias aportaciones en la literatura han ido corroborando la aparición de contractura, tanto durante la fase de isquemia como en preparaciones reperfundidas; hecho aceptado como acúmulo de calcio en la célula miocárdica. (129,130,131,132). Se cita también el desacoplamiento eléctrico resultante, como probable fuente de disritmias severas. Interesantemente, la relación de los radicales libres derivados del oxígeno con dicho fenómeno ha quedado demostrada. (133).

Este incremento de la captación de calcio se relaciona con la aparición de potenciales tardíos (PT) en todo similar a las oscilaciones postexcitatorias inducidas por intoxicación digitálica y secundarias a la entrada masiva de calcio (134). Una vez acumulado, este catión puede incrementar la magnitud de estas oscilaciones eléctricas llevando

a disritmias letales (135).

La integridad de la membrana celular es fundamental para el normal desarrollo de las funciones celulares. Este hecho viene demostrado por los efectos deletéreos y arritmias desencadenadas por los metabolitos anfipáticos (110): losofosfoglicéridos (LFG), lisofosfatidil colina (LFC) y lisofosfatidil etanolamina (LFE) como más representativos, acil carnitinas de cadena larga formados por acción de las fosfolipasas A_1 y A_2 sobre los fosfolípidos de la membrana durante la isquemia y reperfusión. (39,114,120,136,137,138). Se asociaría a la vez una reducción de la actividad de las lisofosfolipasas, lo que redundaría en la acumulación de LFG (110).

Los LFG y acil carnitinas de cadena larga aumentan el automatismo, independientemente de que la célula esté en reposo o parcialmente despolarizada. (120,137). Este efecto probablemente se ve favorecido durante la reperfusión por el brusco descenso del K_o^+ (117), previamente elevado durante la isquemia. (106,115,116). Esta última observación se apoya en dos hechos fundamentales: 1º la oclusión coronaria aisladamente no incrementa el automatismo ventricular (92), 2º está demostrado que concentraciones elevadas de K_o^+ (a partir de 12 mM) lo inhiben. (106,139). Los lisofosfolípidos condicionan también reducción de la corriente rápida de Na^+ y consecuentemente de la V_{max} (fase 0) del PA. También reducen el potencial de membrana a valores menos negativos con la consiguiente despolarización de la membrana. (137,140).

Por otra parte, a bajas concentraciones la LFC acorta el período refractario en fibras de Purkinje, mientras que altas concentraciones lo alargan, provocando a su vez el fenómeno de refractariedad postrepolarización. (137). Probablemente la diferencia en la concentración de metabolitos anfipáticos en diversas partes del miocardio, condicionaría la heterogeneidad eléctrica y la aparición de zonas de bloqueo unidireccional, que conjuntamente con el enlentecimiento de la conducción favorecerían el desarrollo de trastornos del ritmo por reentrada. (140). Se reconoce también un efecto bifásico de la LFC sobre el batmotropismo: aumento inicial seguido de descenso, variables en zonas isquémicas colindantes, debido a cambios de las propiedades pasivas y/o activas de la membrana. (140). Los lisofosfolípidos en general se aglomeran en micelas que al integrarse al sarcolema desarrollan un efecto detergente sobre los fosfolípidos de la doble capa, con formación de soluciones de continuidad en la misma y su posterior destrucción, con alteración de sus componentes protéicos (enzimas, receptores, canales iónicos). (37,38,39). Se describe también el efecto cuña de la LFC que al penetrar la membrana celular la distorsiona, afectando secundariamente el trasiego de iones y las funciones enzimáticas. (37,41). Aún más está reconocido que el radical hidroxilo ataca a los fosfolípidos de la pared celular y estructuras subcelulares (lisosomas) con su consiguiente peroxidación. (142,143). Demopoulos y cols. (144) han comprobado en el sistema nervioso central que los peróxidos lipídicos pueden selectivamente inhibir la síntesis de prostaciclina (PGI_2) favoreciendo así la agregación plaquetaria en la microcirculación con empeoramiento del daño isquémico. A nivel del miocardio, recordemos la activación de la fosfolipasa

A_2 que pone en marcha la cascada de los endoperóxidos cíclicos, formación de PGG_2 y PGH_2 , inhibiéndose también la PGI_2 con predominio de los efectos del tromboxano A_2 . (16,39,53).

Finalmente está demostrado en la rata (145) que una dieta rica en ácido linoléico, ácido graso esencial, modifica sustancialmente los fosfolípidos de la membrana, incidiendo negativamente en la aparición de las arritmias precoces de la isquemia (40). Insistiendo sobre la acumulación de LFG durante este período (146), su efecto arritmogénico se ve incrementado por la mayor heterogeneidad eléctrica creada por el barrido durante la reperfusión (137).

Se ha querido implicar el AMP_c como mediador de las disritmias ventriculares de la isquemia y reperfusión en corazón aislado de rata, entre otras especies. (147,148). Se asocia los disturbios del ritmo durante el período isquémico con el aumento del nucleótido (107,149) que causaría a su vez una aceleración de la corriente lenta de calcio (I_{si}), proponiendo Opie y cols. (106) que estos condicionantes podrían ser fuente de arritmias. Corr y cols. (150) observaron un descenso del AMP_c durante la reperfusión, cuando se da un pico máximo de incidencia de arritmias ventriculares en el gato anestesiado, habiendo comprobado más bien un incremento del mencionado nucleótido paralelamente a la presentación de disritmias severas ventriculares en el modelo de corazón aislado de rata con isquemia regional. (150,101). La relación causa-efecto queda todavía por aclararse.

Hay cada vez mayor evidencia de la intervención de factores adrenérgicos en las arritmias por reperfusión. Según Corr y col. (100) la isquemia miocárdica induciría un aumento en la población de receptores alfa en el gato. Por otra parte, se ha comunicado (99) una marcada incidencia de RIVA durante la reperfusión experimental, hecho atribuido a estimulación de estos receptores alfa por las catecolaminas liberadas al restablecerse el flujo miocárdico. Este automatismo exaltado en las disritmias por reperfusión tiene su implicación en clínica humana por la incidencia de RIVA en los primeros minutos siguientes a una recanalización efectiva mediante trombolisis intracoronaria. (87).

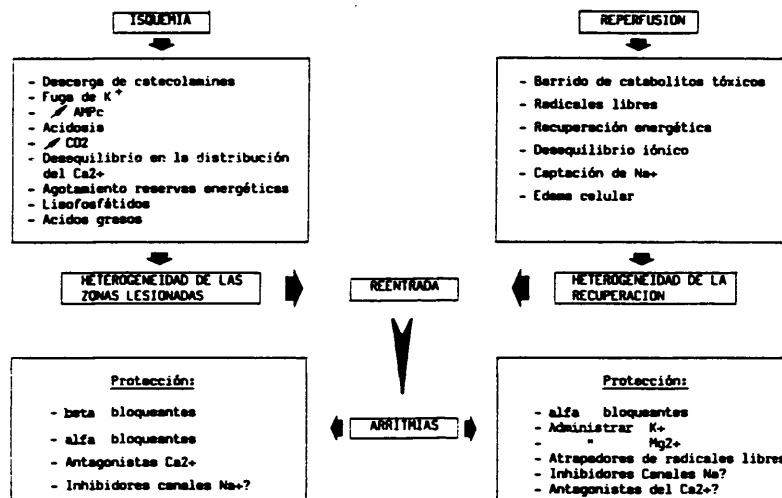
Se ha planteado el papel de los radicales libres derivados del O_2 en las arritmias por reperfusión. En un principio algunos investigadores han querido deslindar entre los procesos de reperfusión y reoxigenación. (105,151).

Es evidente que la reperfusión es un fenómeno complejo aportando a la vez a los tejidos isquémicos oxígeno molecular y sustratos, mientras que el mismo restablecimiento del riego miocárdico ejerce un lavado de los catabolitos almacenados durante la isquemia. Efectivamente, Bagdenas y col. (105) han demostrado que los corazones isquémicos presentan mayor vulnerabilidad a la FV que corazones hipóxicos con mantenimiento del flujo coronario. Además de describir la recuperación rápida del voltaje del PA por reperfusión con soluciones hipóxicas (89), se ha podido demostrar también una reducción en la incidencia de arritmias con enlentecimiento controlado del ritmo de reperfusión

(152). Este último dato se explicaría por el barrido más lento y uniforme de los catabolitos tóxicos, lo que redundaría en cierto modo en el mantenimiento de la homogeneidad eléctrica, y consecuentemente asegurando cierta protección contra arritmias ventriculares (85). La protección prestada por las soluciones anóxicas (151) o hipóxicas claramente apunta hacia los efectos tóxicos de la reoxigenación por la formación de radicales libres tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidróxilo (OH^{\cdot}) además de H_2O_2 en el miocardio (6,71,75).

Las salvas de TV y finalmente desencadenamiento de FV durante los primeros minutos de la reperfusión, con los radicales libres como responsables, viene apoyado por varios trabajos. Tenemos el argumento irrefutable de Bernier, Hearse y Manning (75) que observaron una importante reducción de las arritmias por reperfusión en el corazón aislado de rata utilizando glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD) u orgoteina, dos reconocidos barredores de radicales libres. En este mismo contexto otros equipos de investigadores han obtenido resultados alentadores utilizando otros fármacos y sustancias que directa o indirectamente afectan a la formación de derivados oxigenados tóxicos (76,77). Recordemos que la xantina oxidasa se acepta como la enzima principal en la cascada de reacciones que lleva a la síntesis de radicales libres (Cuadro 1). Así pues, Manning y col. (71) han observado en la rata que el Alopurinol, inhibidor específico de la xantina oxidasa, reduce la incidencia de FV que acompaña a la reperfusión. En la misma línea de ideas, Akisuki, Yoshida y cols. (72) han demostrado que el Alopurinol limita la zona infartada en el perro sometido a oclusión coronaria

CUADRO 3
MECANISMOS RESPONSABLES DE LAS "ARRITMIAS PRECOCES" DE LA ISQUEMIA Y REPERFUSION
MODOS DE PREVENCIÓN



Modificado de Manning y Hearse

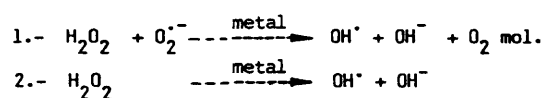
permanente. Otros investigadores utilizando el modelo de isquemia y reperfusión en el perro anestesiado describen la recuperación, estadísticamente significativa, de las funciones sistólicas ventriculares en los animales pretratados con una solución de SOD (atrapador de radical superóxido $O_2^{\cdot-}$) y catalasa que transforma el H_2O_2 en agua y oxígeno molecular. (57). También se preconiza el efecto protector de las funciones mecánicas y subcelulares (transporte de Ca^{2+} por el retículo endoplasmático) utilizando una solución cardiopléjica compuesta de SOD, Manitol como barredor de radicales hidróxilo (OH^{\cdot}) y Cloruro potásico (KCl). (76). El cuadro 3, modificado de Manning y Hearse (85), esquematiza los mecanismos responsables de las disritmias precoces que acompañan al síndrome de isquemia-reperfusión y los diferentes medios disponibles de prevención.

JUSTIFICACION DE LA TESIS

Con el auge de las técnicas de trasplante y revascularización de órganos, han ido surgiendo problemas tanto diversos como complejos relacionados con la isquemia y reperfusión tisular. A nivel del corazón, las arritmias severas, cuyo máximo exponente es la FV, constituyen un reto frente a los beneficios potenciales del pontaje aorto-coronario y recanalización miocárdica mediante trombolisis intracoronaria y ACTP.

El debate se centra en las posibles causas del daño celular durante la isquemia y reperfusión, barajándose factores metabólicos relacionados con la peroxidación de los lípidos de la doble capa, acúmulo de calcio citosólico y efecto paradójico de la reoxigenación con la liberación de radicales libres derivados del oxígeno.

Se escogió la perfusión de H_2O_2 aisladamente a diferentes molaridades, por ser intermediario en la generación del muy tóxico radical libre hidroxilo (HO^\bullet) vía de las reacciones de Haber - Weiss (reacción 1) y Fenton (reacción 2):



Además, en el caso concreto de la isquemia, la xantina-oxidasa formada en esta fase transporta un electrón al oxígeno que vuelve con la reperfusión,

reduciéndolo a radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A su vez, la Superóxidodismutasa (SOD) cataliza la dismutación de este último a $H_2 O_2$ (18).

Los disturbios del automatismo y de la conducción provocados por $H_2 O_2$ estudiados mediante registros endocavitarios y de superficie, se comparan con las disritmias observadas, trabajando con el modelo de isquemia-reperfusión en el corazón aislado de rata, con el propósito de demostrar que son equiparables.

Se fijaron unos criterios propios, siendo la prevención de la FV o evitando su irreversibilidad el punto de referencia para decidir la capacidad de protección de las sustancias utilizadas; mientras en la literatura se habla más bien en términos de reducción significativa o no de las arritmias y FV.

Por otra parte, el modelo experimental se demuestra asequible, de bajo costo, a la vez que fiable para el análisis de las arritmias precoces y - FV mediadas por los radicales libres derivados del oxígeno; comparado con los medios usados por otros investigadores: Xantina + Xantina Oxidasa + EDTA Fe^{3+} (6), Hipoxantina + Xantina Oxidasa (22), $Fe Cl_3$ + ADP (75), Xantina Oxidasa + Purina (172).

Finalmente, la metodología está reforzada por el uso de reconocidos - barredores "scavengers" del radical hidroxilo (OH^{\cdot}), que a la vez pueden tener trascendencia clínica en la prevención de las arritmias mediadas por esa especie activada del oxígeno en el síndrome de isquemia-reperusión.

MATERIAL Y METODOS

Ochenta ratas adultas de la raza Wistar pesando entre 250-300 gramos, sin consideración de sexo, sirvieron de base para la serie experimental. Se mantiene al animal previamente heparinizado durante 30 minutos inyectando 0,2 UI de Heparina sódica al 1% por vía intraperitoneal y sin anestesiarse.

Transcurrido este intervalo, se le practica una dislocación cervical y se secciona el cuello, dejándole desangrar brevemente. Acto seguido, se completa la disección del peto costal y se extrae al corazón, colgándole por la aorta a una cánula de Gaddum. Estas maniobras deben realizarse en un tiempo no superior a los dos minutos. También el órgano queda fijado al fondo de un baño de cristal provisto de una anilla, mediante una sutura de seda en asa en el ápex, con el cabo terminal unido a una pesa de 2 gramos, asegurando así una precarga constante. La funcionalidad del sistema viene prestada por una polea ajustable.

Fundamentalmente, se utiliza el sistema de perfusión tipo Langendorff (153) que comporta dos vasos unidos independientemente a un serpentín doble abocando a la cánula de Gaddum mediante sendos tubos de polietileno. En su punto de unión, una llave de doble paso permite permutar el flujo de las copas independientemente, según las fases del experimento. A su vez el sistema incluye llaves metálicas complementarias para cortar la perfusión del corazón, provocando isquemia global "ad libitum". El sistema se mantiene a temperatura constante de 37° C con agua destilada

circulando en circuito cerrado, mediante una bomba térmica (Braun-Thermomix, 1419). Va también incluida la termoregulación del baño diseñado por Ramón y cols. (154). Es una cubeta de doble pared, de 5 cms. de diámetro y 6 cms. de profundidad, donde se sumerge el corazón aislado evitando así el gradiente de temperatura endoepicárdico (Fig. 4). Queda establecida una columna líquida de 100 cms. entre los vasos gaseados con un burbujeo de carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2) y la punta de la cánula de perfusión, procurando así una presión de agua equivalente y constante para mantener el riego coronario.

El baño va provisto de 4 electrodos de plata dispuestos ortogonalmente para recoger el electrocardiograma (ECG) de superficie. Los electrogramas del sistema específico de conducción (SEC) se obtienen simultáneamente mediante un electrocateter cuadripolar constituido por cuatro hilos de plata que se exteriorizan en el extremo distal de un tubo de plástico y separados 1 mm. entre sí, estando el primer electrodo a 2 mm. del cabo terminal del tubo que mide 6 cms. El catéter se introduce por una abertura practicada en la pared anterior de la aurícula derecha, abordando así el septo interauricular donde queda apoyado a nivel del anillo de la válvula tricúspide. Tanto los electrodos del baño como los del catéter conectan con una caja de conmutación (Electrocath Corporation Rahway, New Jersey) a su vez en serie con un polígrafo y una pantalla osciloscópica (Hewlett Packard 1308-A).

La actividad eléctrica del corazón se registra mediante el polígrafo de 4 canales MINGOGRAPH-80 ELEMA SCHONANDER a chorro de tinta en papel

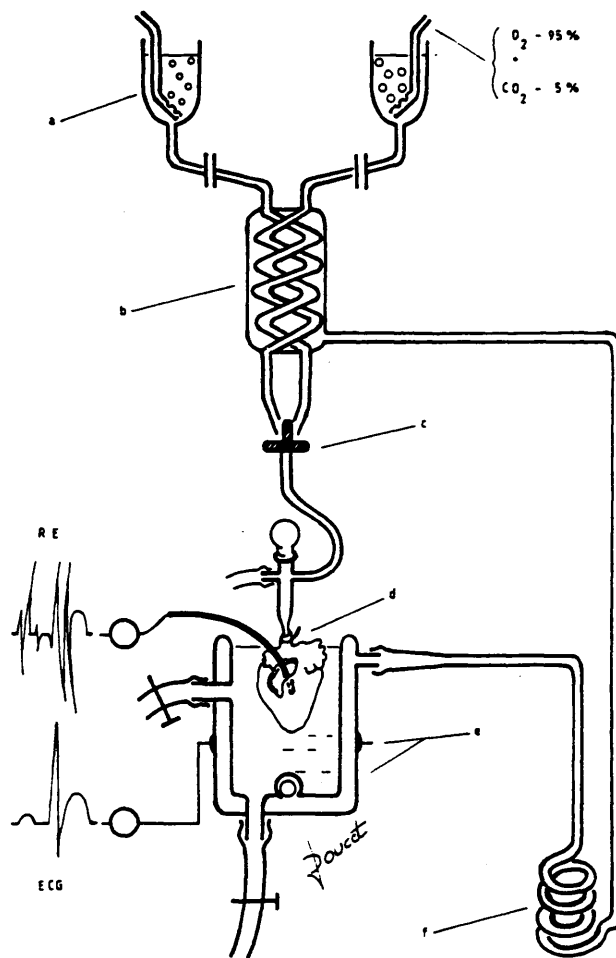


Fig.4. Sistema de perfusión modificado de Langendorff. a) copas de perfusión gaseados con carbógeno (O_2 95% ; CO_2 5%), b) serpentín doble, c) llave de doble paso, d) aorta canulada, e) baño de doble pared con electrodos de plata para registro del ECG; RE (registro endocavitario mediante electrocatéter de plata colocado en aurícula derecha), f) bomba térmica. (Más información en el texto)

milimetrado, a la velocidad de 250 milímetros por segundo cada 5-10 minutos o según el desarrollo de los fenómenos observados en el osciloscopio. Las secuencias largas se recogen a velocidades más reducidas de 25-50 y 100 milímetros/segundo.

La perfusión del corazón se inicia con Tyrode como líquido nutricio a pH-7,4 compuesto de NaCl (137 m M) KCl (2,7 m M) CaCl_2 (1,8 m M) MgCl_2 (0,5 m M) Glucosa (5,5 m M) CO_3HNa (12 m M) PO_4HNa (0,420 m M) hasta 1000 mililitros de agua destilada gaseado también con carbógeno. Se deja a la preparación 20 minutos de recuperación antes de grabar los registros basales.

Fundamentalmente, se siguieron los protocolos que se exponen a continuación , teniendo como objetivo principal la consecución o no de fibrilación ventricular como máximo exponente de la amplia gama de disritmias posibles, lo que marca el final de cualquier experimento, igual que la aparición de asistolía y parada cardíaca.

PROTOCOLOS

I.- Acción de diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

El peróxido de hidrógeno es un líquido incoloro con olor apenas perceptible y potente agente oxidante. Se utiliza comunmente en el medio hospitalario como desinfectante y antiséptico. Su acción se debe a la liberación de oxígeno disuelto durante el efecto efervescente al entrar

en contacto con los tejidos y mucosas.

Se presenta industrialmente a concentraciones elevadas de 50%-85% que luego se reducen a diluciones variadas para uso clínico: 3% y 10 volúmenes; 6% y 20 volúmenes; 27% y 100 volúmenes. (155).

Sin embargo el peróxido de hidrógeno también se origina naturalmente en el organismo en el curso de oxidaciones biológicas mediadas por la enzima xantina oxidasa y Co-enzima NADPH entre otros factores. Forma parte de los metabolitos tóxicos del oxígeno responsables de una dilatada gama de efectos nocivos, contra los cuales nuestra economía posee ciertas defensas como las superóxido dismutasas, (SOD) glutatión peróxidasas y catalasas.

Diferentes autores han ideado varios sistemas para originar metabolitos superóxidos tóxicos: Xantina + Xantina Oxidasa + EDTA Fe^{3+} (6), Hipoxantina + Xantina oxidasa según Ytrehus y cols. (22), FeCl_3 .ADP por Bernier, Hearse, Manning (75) y Xantina-oxidasa + purina (172) en experiencia de otros.

Este hecho unido a la intervención directa del peróxido de hidrógeno en las reacciones de HABER-WEISS y FENTON reseñados previamente fijó nuestra decisión en utilizar el H_2O_2 como fundamento de las investigaciones que se llevaron a cabo.

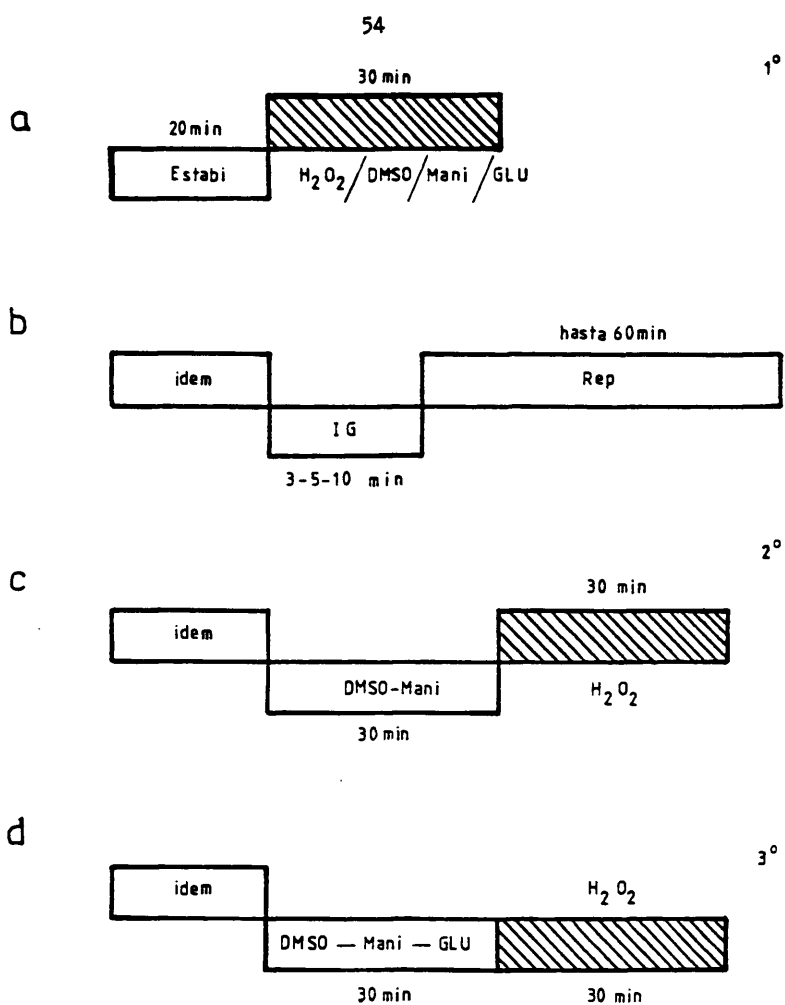
Usamos en un primer ensayo diferentes diluciones de H_2O_2 obtenidas

a partir de la presentación clínica al 3% - 10 volúmenes, totalizando una serie de 21 experimentos distribuidos como sigue: 5 con 2,9 mM; 4 con H_2O_2 5,9 mM; 6 experimentos con H_2O_2 12 mM y 6 con H_2O_2 29 mM. Las diluciones se prepararon con el Tyrode usado para la perfusión general. Se escogió este rango de concentración considerando experimentos anteriores de Van Der Gool, Ramón y Carmeliet con fibras ventriculares aisladas de cobaya; no habiendo observado ningún efecto relevante usando molaridades por debajo de 2,9 mM (156).

El protocolo se diseñó según el siguiente esquema (Fig. 5a). Una vez concluidos los 20 minutos de estabilización de la preparación se procede a grabar los registros de control. Seguidamente se abre la llave de doble paso hacia el frasco conteniendo la concentración de H_2O_2 en estudio también gaseado con carbógeno. Se puede también añadir el peróxido de hidrógeno en el mismo frasco del Tyrode una vez se haya vaciado totalmente su contenido.

Se usa un máximo de 250 ml. de solución por copa lo que mantiene la perfusión por un tiempo medio de 15 minutos, volviendo a añadirse la misma cantidad al quedarse reducido a la 1/4 parte del volumen inicial. Se mantiene el burbujeo de carbógeno durante toda la prueba. Hay que subrayar que se gasea ininterrumpidamente la masa total de Tyrode, tanto las soluciones en perfusión como los matraces de reserva. Se utilizaron grupos diferentes de ratas para cada concentración.

La prueba concluye con la aparición de fibrilación ventricular irreversible de más de 3 minutos de duración (Fvi).



PROTOSCOLOS DE TRABAJO

Fig.5. En todos los protocolos estudiados, la primera fase corresponde a 20 minutos de estabilización. En la segunda fase, se valoran los efectos de H_2O_2 , DMSO, Manitol, Glucosa, perfundidos aisladamente (1º protocolo) con excepción del protocolo de isquemia global y reperfusión (IG y Rep) señalado con (b), en el cual la 2ª fase corresponde a la IG. La tercera fase abarca la reperfusión en el protocolo de IG y Rep. o la comprobación del efecto protector de DMSO, Manitol o Glucosa — respecto a H_2O_2 añadido en esta fase (protocolos 2º y 3º). H_2O_2 se añade sucesivamente a DMSO, Manitol o Glucosa (2º protocolo) y simultáneamente con estas sustancias (3º protocolo). (Más información en el texto)

II.- ISQUEMIA GLOBAL Y REPERFUSION

Se ha visto que la isquemia global o regional del corazón seguido de reperfusión conlleva la aparición de disturbios del dromotropismo y del automatismo con aparición de disritmias letales. Es factor decisivo el tiempo de isquemia previa a la reperfusión. Siguiendo la línea de ideas de Manning y Hearse (85) se estudiaron los patrones (3 series) experimentales de los 3 - 5 y 10 minutos de isquemia pero seguidos de 1 hora de reperfusión. (Fig. 5 b), a diferencia de los citados autores que no sobrepasan de 3 - 10 minutos. Nos propusimos observar toda la gama de arritmias posibles y su modo de terminación. También provocamos isquemia global, cortando el flujo hacia la aorta, mientras el mencionado grupo utiliza isquemia regional mediante ligadura de la arteria coronaria descendente anterior (DA).

Una vez registrados los electrogramas basales tras los 20 minutos de recuperación, se cierra completamente el circuito mediante la llave de doble paso, durante 3 - 5 ó 10 minutos antes de reperfundir. Se toman registros a los 3 y 5 minutos de isquemia y cada 10 minutos durante los 60 minutos de reperfusión. En el grupo de los 10 minutos de isquemia se registran datos a los 5 y 10 minutos de isquemia, y cada 10 minutos durante la reperfusión. Se toma constancia de las arritmias que van surgiendo en el intervalo, dando por finalizada la prueba al surgir el primer brote de fibrilación ventricular de más de 3 minutos de duración.

Este grupo engloba un total de 10 corazones distribuidos como sigue: 4 en la serie de los 10 minutos de isquemia y 3 respectivamente

para las series de los 3 y 5 minutos de isquemia global y ~~reperfusión~~ ^{reperfusion} (IG-Rep).

III.- ENSAYO CON DIMETIL SULFOXIDO. (DMSO)

El Dimetil Sulfóxido (CH_3)₂SO y peso molecular 78,13 es un líquido viscoso, inodoro y de sabor amargo, sensible a la luz. Es soluble en agua, sobre todo en presencia de calor. Tiene también buena solubilidad en alcohol, éter, cloroformo y la mayoría de disolventes orgánicos.

Se emplea como disolvente industrial por facilitar la absorción de varios fármacos: corticoides, hormonas, salicilatos, etc. Se absorbe por vía oral, tópica y parenteral. Al DMSO se le reconoce propiedades antiflogísticas, analgésicas, bacteriostáticas, diuréticas y vasodilatadora, amén de atravesar la membrana celular y disolver la colágena. De aquí su uso en clínica humana en procesos tales como la artritis reumatoide, edema cerebral y amiloidosis, entre otros (155). Se sostiene que su efecto beneficioso puede atribuirse a su capacidad de atrapar radicales libres hidroxilo (OH^{\cdot}) (157).

En esta misma línea de ideas, investigamos sus efectos en el modelo de perfusión con H_2O_2 a diferentes concentraciones, a cuyo fin se diseñaron 3 protocolos. Una serie especial se realizó previamente para estudiar los posibles efectos del DMSO sobre el miocardio de la rata. (Fig. 5 a) (1º protocolo).

Se contabilizó un efectivo de 22 experimentos con DMSO distribuidos

según sigue: A la concentración de 10^{-3} M se realizaron 18 pruebas, 4 de ellos con el DMSO aisladamente perfundido durante 30 minutos (Fig. 5 c).

En los 11 restantes se prosiguió el test (1º protocolo + 2º protocolo) añadiendo peróxido de hidrógeno al sistema de perfusión una vez concluidos los 30' de exposición de los corazones al DMSO. (2º protocolo) (Fig. 5 c). Otros 3 experimentos con DMSO a la concentración de 10^{-3} M pertenecen a la serie comparativa, así como 4 más con DMSO 10^{-3} M perfundido ininterrumpidamente (3º protocolo). (Fig. 5 d).

Se registran los electrogramas y ECG basales al final de los 20 minutos de recuperación. Acto seguido se inicia la perfusión con DMSO por un periodo de 30 minutos. Se toma constancia de los registros cada 10 minutos, o en cualquier momento que se observe alguna anormalidad por la pantalla del osciloscopio. Concluidos los 30 minutos se inicia la perfusión con H_2O_2 (Fig. 5 c) siguiendo la misma pauta de registro, y dando la prueba por concluida si se presenta FV de más de 3 minutos de duración.

La serie paralela se preparó montando un grupo de experimentos modificando la pauta de administración de los fármacos. Se procedió de forma similar a lo descrito anteriormente hasta llegar a la 2ª fase. Entonces el H_2O_2 se añade conjuntamente con el DMSO en la misma copa de perfusión. Dicho en otros términos, se mantiene el flujo de DMSO durante toda la prueba (Fig. 5 d).

Se respetaron las dosis de H_2O_2 y DMSO en 3 corazones, 12 mM y 10^{-3} M respectivamente. En otras cuatro preparaciones se confrontó también el efecto de DMSO a la concentración de 10^{-2} M con el H_2O_2 12 mM.

En esta segunda fase de la perfusión, se observó la evolución de la prueba durante 30 minutos, a final de los cuales se da por concluido el experimento; habiéndose presentado o no fibrilación ventricular, asistolia y/o ritmo auricular con bloqueo nodal completo (RA y BNC).

IV.- ENSAYO CON MANITOL

El Manitol, de peso molecular 180, 2 y fórmula empírica - - - $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ es un alcohol-azúcar derivado de la manosa por reducción del grupo aldehído en alcohol (158). Es un polvo blanco cristalino, inodoro y sabor dulzón, presentado en soluciones al 10%, 20%, 25% para uso clínico como diurético osmótico parenteral (155).

Tiene muy poco valor energético en el organismo puesto que se elimina en su casi totalidad por el riñón antes de ser metabolizado. Administrado por vía oral, también se excreta la mayor parte por vía renal, metabolizándose el resto en el hígado hasta dióxido de carbono (155). Está descrito en la literatura como posible atrapador o barredor de metabolitos tóxicos del oxígeno, principalmente el radical hidróxilo OH^\bullet (159).

Siguiendo esta premisa, montamos 3 protocolos paralelos con Manitol al 20%, usando las concentraciones molares: 5 mM ó $5 \cdot 10^{-3}$ M y 50 mM

ó $5 \cdot 10^{-2}$ M; dosis recomendadas por Bernier y cols. (75).

De un total de 23 experimentos con Manitol, primero se elaboró una tanda de 11 corazones para destacar posibles efectos del fármaco sobre el miocardio, (1º protocolo) (Fig. 5 a), siguiendo una pauta superponible a la descrita para el DMSO. Cinco preparaciones sirvieron para estudiar el fármaco a la concentración de 5 m M y seis para la concentración de 50 m M.

Los restantes 12 experimentos se distribuyeron como sigue: En cuatro pruebas, una vez cumplidos los 30 minutos de perfusión con Manitol 5 mM, se añadió H_2O_2 aisladamente a la concentración de 12 mM (1º protocolo y 2º protocolo). En otros cuatro experimentos, y siguiendo la misma sistemática se estudió el comportamiento de Manitol 50 m M frente a la misma concentración antedicha de H_2O_2 (Fig. 5 c). Finalmente los cuatro últimos corazones entraron a formar parte del protocolo de comparación (3º protocolo) perfundiendo con Manitol ininterrumpidamente. Al concluir los 30 minutos de Manitol actuando aisladamente, se le mezcló H_2O_2 12 mM dejando el experimento seguir su curso durante otros 30 minutos hasta la ~~aparición~~ aparición o no de FV. En este último grupo, se trabajó con Manitol 50 m M (Fig. 5 d).

Independientemente del grupo considerado, se tomó registro gráfico cada diez minutos y ante cualquier indicio de disritmias por el osciloscopio. La secuencia de fenómenos se siguió un promedio de 30 minutos valorando como acontecimiento terminal cualquier brote de FV o asistolia de 3 minutos

de duración. Se interpreta como FV reversible la recuperación del ritmo sinusal en un promedio de 3 minutos (RS).

V.- ENSAYO CON GLUCOSA

La glucosa anhidra de fórmula general $C_6H_{12}O_6$ es un monosacárido de peso molecular 180,2. Se encuentra como cristales incoloros o polvo granulado blanco inodoro y sabor dulzón. Es soluble en agua en proporción de 1/1 y 1/200 en alcohol. La solución al 5,05% en agua es isoosmótica con el suero (155).

La glucosa se absorbe tanto por vía parenteral como oral. La primera condición para ser utilizada por la célula es su paso a G6P (éster de Robinson), lo que constituye la fosforilización oxidativa (158). Las vías principales de metabolización son por glicólisis aerobia llevando a la formación de ácido pirúvico como producto final, la vía anaerobia con formación de ácido láctico por reducción del ácido pirúvico y la ruta del ciclo de Krebs de los ácidos tricarboxílicos (ácido cítrico) hasta el dióxido de carbono y agua. El atajo de las pentosas, como vía alternativa lleva también a la formación de dióxido de carbono y agua. El resultado de estos procesos metabólicos es la producción de energía en forma de ATP (158). Van der Heyden, Carmeliet y cols. (160) han observado una inversión de los efectos nocivos del 2,4 dinitrofenol (DNF) y del cianuro (desacoplador de la fosforilización oxidativa e inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial respectivamente) y de la hipoxia sobre miocitos aislados de ventrículo de cobaya al incrementar la concentración

de glucosa del líquido de perfusión hasta 20 mM.

Sobre esta base, se montó un protocolo paralelo de cuatro experimentos con Glucosa 20 mM y peróxido de hidrógeno 12 mM para estudiar las respuestas en el modelo de corazón aislado de rata.

En una primera fase, se perfundió con Glucosa durante 30 minutos para descartar cualquier efecto sobre el miocardio. Seguidamente, se añadió H_2O_2 12 mM a la solución glucosada, manteniendo la perfusión otros 30 minutos y observando las arritmias desencadenadas hasta la consecución o no de FV, ritmo auricular con bloqueo nodal o asistolia, (Fig. 5 d) (3º protocolo). Queda claro que las mismas preparaciones sirvieron para ambas fases del estudio.

TECNICA DE REGISTRO

Se registró la actividad global del corazón mediante cuatro electrodos de plata dispuestos ortogonalmente en la doble pared de cristal del baño del sistema de perfusión ya descrito en apartados anteriores, obteniendo así el ECG de superficie. Simultáneamente se registra la actividad del sistema específico de conducción del corazón mediante un electrodo de plata apoyado a nivel del anillo de la válvula tricúspide.

Se puede observar en la Fig. 3 el registro típico de los electrogra-

mas auricular, hisiano y ventricular obtenidos de la rata simultáneamente con el ECG. El espacio PA que se mide desde el nivel de la onda P de electrocardiograma hasta la primera deflexión rápida del auriculograma, representa el tiempo de conducción intraauricular derecha. El intervalo AH se acepta como el tiempo de conducción auriculoventricular a través del nodo AV, y es la distancia en milisegundos desde la primera señal rápida auricular hasta el electrograma del haz de His que suele ser bifásico. El espacio HV es el tiempo de conducción desde esta estructura hasta el ventrículo. Con la finalidad de obtener el máximo de información sobre la progresión del frente de activación, se subdivide en: tiempo HQ medido desde la espiga del His hasta el primer indicio de actividad ventricular e interpretado como la conducción desde el tronco común hasta la red de Purkinje, y tiempo QV. Este último espacio nos da la conducción desde la red de Purkinje hasta la "musculatura de trabajo". Se valora desde el inicio de la actividad eléctrica ventricular hasta la primera deflexión rápida del ventriculograma.

La frecuencia cardíaca se estima indirectamente a partir de la longitud de ciclo, como intervalo V-V ó A-A. Todas las mediciones se realizaron manualmente, teniendo como referencia la velocidad del papel de registro a 250 mm/seg. El seguimiento de cualquier disritmia de larga duración se realizó generalmente a frecuencias más reducidas de 25 - 50 ó 100 mm/seg.

CRITERIOS GENERALES PARA CATALOGACION DE LAS ARRITMIAS:

Los criterios de severidad son los universalmente aceptados, con la salvedad de que tuvimos que poner nuestros límites propios para catalogar los experimentos que pudieran recuperar la actividad sinusal y conducción auriculoventricular después de fibrililar:

1º.- Se da por concluido todo experimento que presenta FVi, (precedido o no de flutter ventricular), de más de tres minutos de duración, seguido de ritmo auricular mantenido por más de 15 minutos o entrando directamente en RA con bloqueo nodal completo.

2º.- Se admite como criterio de reversibilidad de la FV en cualquiera de los supuestos, el hecho de recuperar el RS y la conducción AV en un tiempo máximo de 3 minutos, manteniéndose por más de 5 minutos, y sin nuevos episodios de FV.

3º.- Se fijó en 30 minutos el tiempo límite de observación para determinar la capacidad de protección de cualquiera de los fármacos utilizados, evitando la presentación de FV, o en caso de presentarse su reversibilidad en un plazo máximo de 3 minutos.

4º.- Se permite "hasta 60 minutos de observación" en cualquier experimento que recupere la actividad sinusal y conducción AV (CAV).

5º.- Todas las gráficas (Figs. 9 a,b,c,d; 14 a,b,c; 16-1 a y

b; 16-2 a y b; 16-3 a y b; 17-1 a y b; 17-2 a y b; 18-1 a y 2 a), reflejan las variaciones de los parámetros intracavitarios hasta la presentación de FV precedido o no de flutter (fv).

62.- Comúnmente se emplea la fórmula de Bazzet para ajustar los cambios del intervalo QT a las variaciones del ciclo cardíaco, lo que lleva al concepto de QT corregido (QT_c) (161). Pero la tabla de Ashman (162) para la frecuencia cardíaca tiene un límite máximo de 100 a 160 l/m., cuando las ratas Wistar en este trabajo presentaron en situación basal entre 218 a 230 l/m. (calculado a partir del ciclo control) (tabla 1). Por otra parte, se sostiene (163, 164) que para frecuencias inferiores a 50 l/m o superiores a 100 l/m. las mediciones del QT_c carecen de fiabilidad; razones por las cuales no se utilizó en estas investigaciones.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

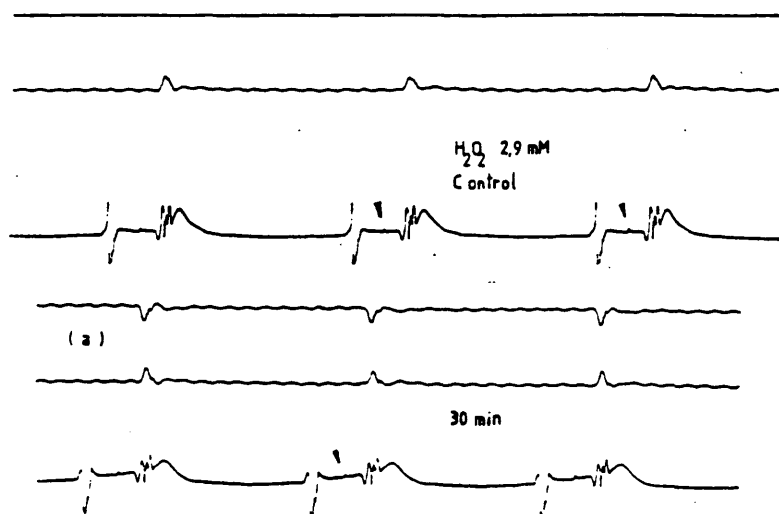
La totalidad de valores recogidos fueron sometidos a estudio estadístico, calculando la media aritmética, desviación y error estándar y contrastando los resultados mediante la "prueba T" de Student para datos apareados.

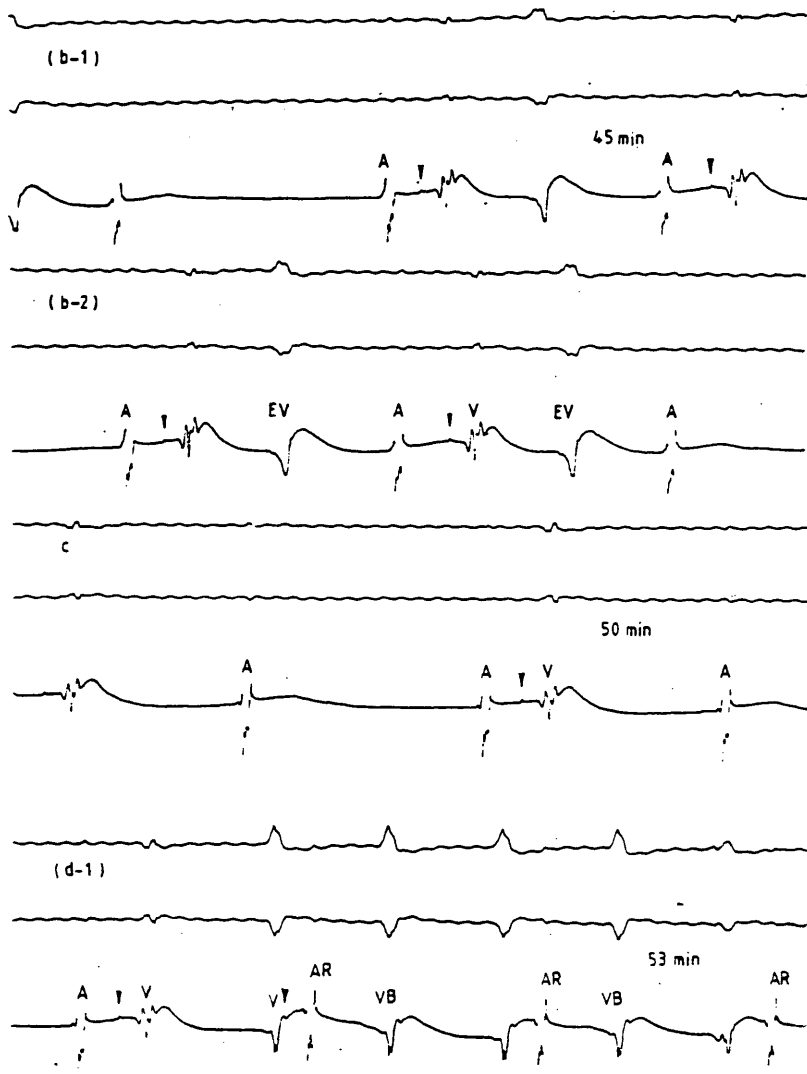
La prueba de la chi-cuadrada (χ^2) se utilizó para los datos presentando una distribución numérica discreta, aplicando además la corrección de Yates para muestras reducidas. Las tablas y gráficas presentan valores

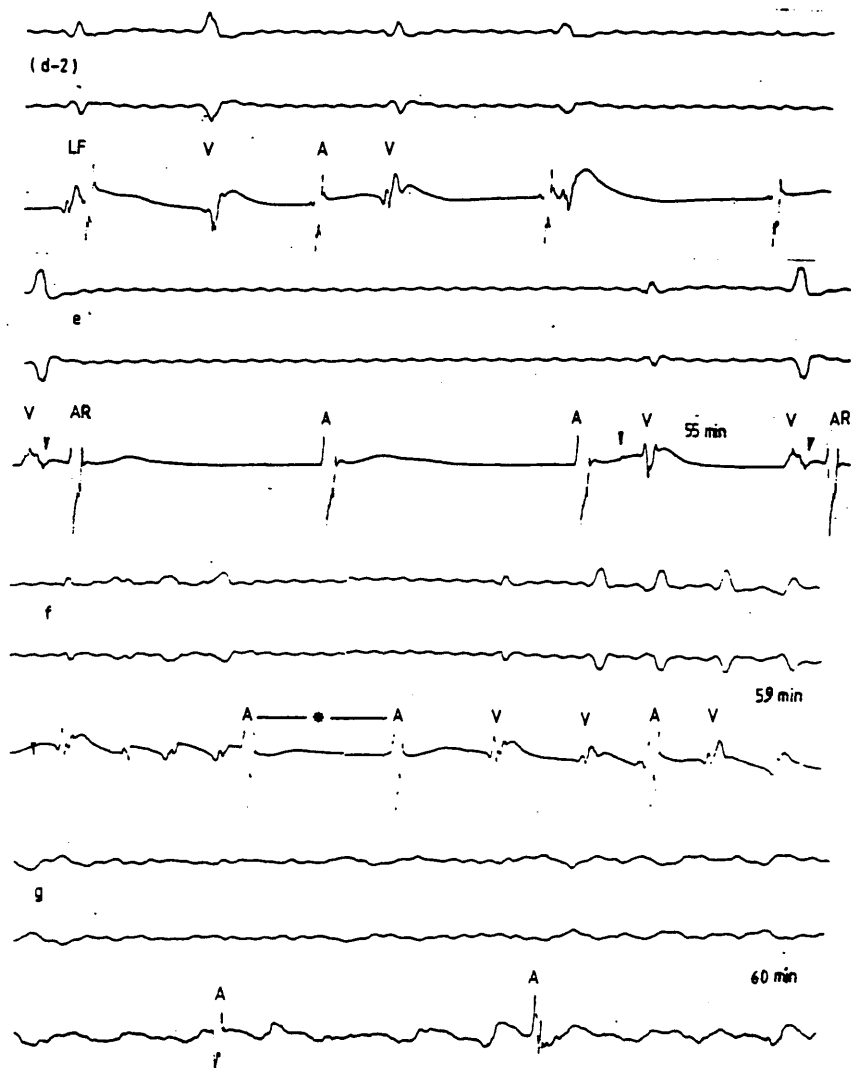
de la media aritmética hallada con su error estandar (\pm SEM). La significación estadística para cada parámetro y fenómeno analizados viene fijada por valores de probabilidad $p < 0,050$. El efectivo de los corazones - utilizados ($n=80$) sirvieron como su propio control (Tabla 1).

RESULTADOSACCIONES DE H_2O_2 PERFUNDIDO AISLADAMENTE

El peróxido de hidrógeno a todas las concentraciones utilizadas, produjo fibrilación ventricular irreversible (FVi) (Fig. 6g), diferenciándose fundamentalmente en el curso de las respuestas llevando a esta arritmia letal. Los resultados llevados a un sistema de coordenadas, demuestran que la aparición de FV guarda una relación previsible en el tiempo con relación a la dosis, adoptando la morfología de una hipérbola equilátera con un buen coeficiente de correlación ($r = -0,77$) (Fig. 7).







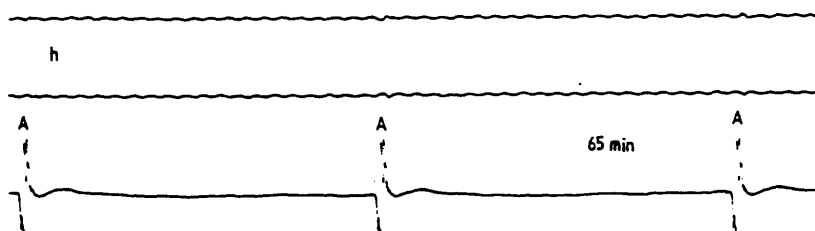


Fig.6. H_2O_2 2,9 mM perfundido aisladamente. A los 45 minutos de perfusión (trazado continuo en planchas b-1 y b-2) se observa la iniciación de bloqueo nodal (BN) tipo Wenckebach 3:2 acompañado de bigeminismo ventricular. A los 50 minutos, se establece BN 2:1. A los 53 minutos hay un breve episodio de conducción retrógrada con bloqueo retrógrado 2:1 pasando a DAV (tira continua en planchas d-1 y d-2). Vuelve la conducción retrógrada a los 55 minutos. A los 59 minutos (plancha f) sigue DAV y bloqueo nodal (El ciclo A-A señalado con asterisco se acortó para facilitar el montaje). Se desencadenó FV bruscamente a los 60 minutos acompañado de DIV típica (plancha g) pasando a RA a los 65 minutos (plancha h). C (control), A (auriculograma), V (ventrículo), la cabeza de flecha señala la espiga hisiana, EV (extrasístole ventricular), AR (auriculograma retrógrado), VB (latido ventricular bloqueado), LF (latido de fusión). (Se amplia la información en el texto)

A la concentración de 29 mM, el 83,33% (n= 6) de los experimentos llegaron a fibrilar en los primeros minutos de la reperfusión ($11,80 \pm 1,113$ min.) sin recuperación del ritmo sinusal (RS), marcando así la irreversibilidad de la arritmia (Tabla 2 y 3) (Fig. 8 a). Algo similar ocurrió a la molaridad de 12 mM, fibrilando irreversiblemente el 83,33% (n=6) a los $13,60 \pm 1,122$ min. (Fig. 8 a). A las molaridades de 5,9 mM y 2,9 mM, la FVi apareció entre los $35,33 \pm 8,819$ min. y $60,5 \pm 2,101$ min. respectivamente ($P < 0,001$) respecto a las molaridades superiores (Tabla 3); y en el 75% (n= 4) y 80% (n= 5) de los casos también respectivamente (Fig. 8a) (Tabla 2). Hay que recalcar ya que - cada uno de los corazones que no fibrilaron, acabaron en ritmo auricular (RA) con bloqueo nodal completo, excepto un 16,66% del grupo de H_2O_2 (29 mM) que presentó asistolia terminal de dos minutos de duración antes de completarse once minutos de perfusión, seguido de RA y bloqueo nodal completo hasta 60 minutos de observación. Quiere esto significar que el 100% de las preparaciones acabó en RA y bloqueo nodal completo independientemente de la concentración y del tiempo de presentación de FV o asistolia.

Aparte de las múltiples arritmias surgidas, (aspectos analizados más adelante), el peróxido de hidrogeno alteró significativamente los registros eléctricos, tanto intracavitarios como de superficie, lo que en cierta medida es manifestación de trastornos de la conducción y del automatismo.

Perfundiendo con 2,9 mM, el efecto general es el alargamiento

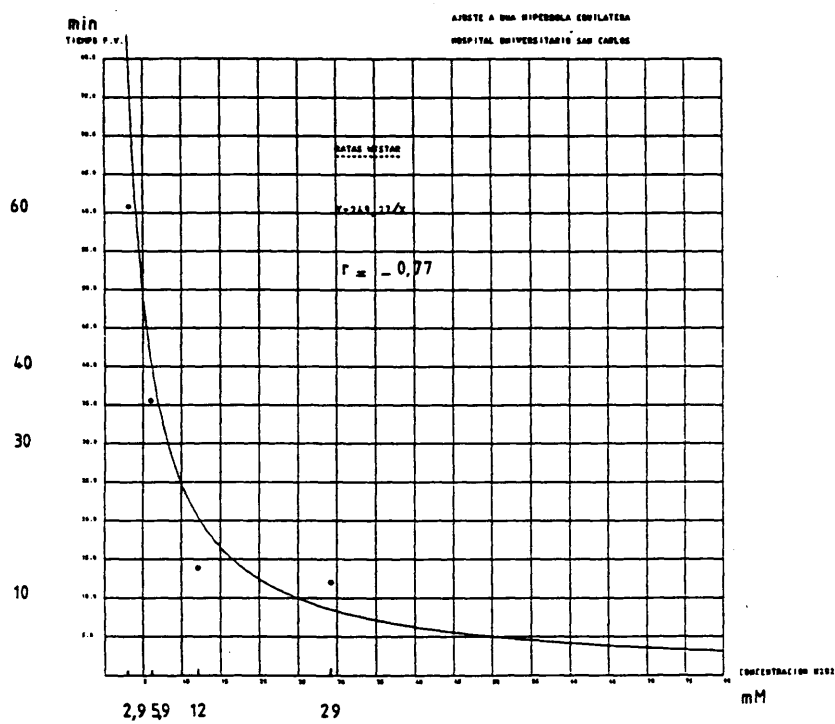
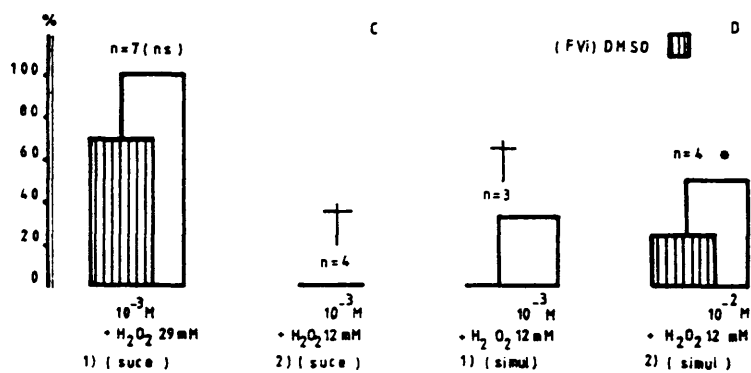
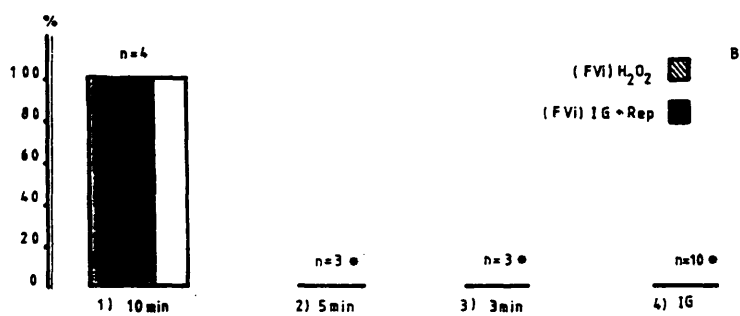
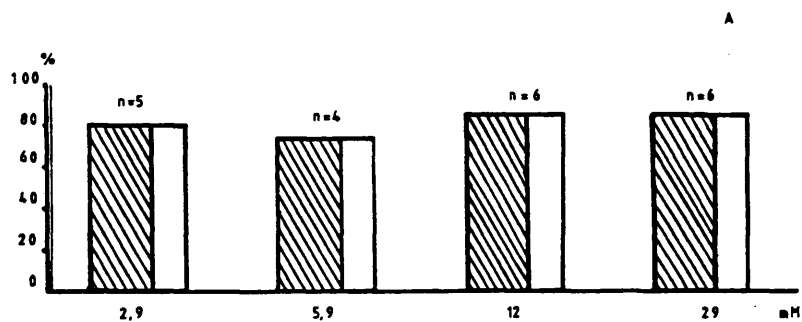


Fig.7. Curva relacionando la concentración de H₂O₂ (mM) en abscisas con el tiempo de aparición de FV (minutos) en ordenadas. (Más información - en el texto)

INCIDENCIA FVG versus FVi



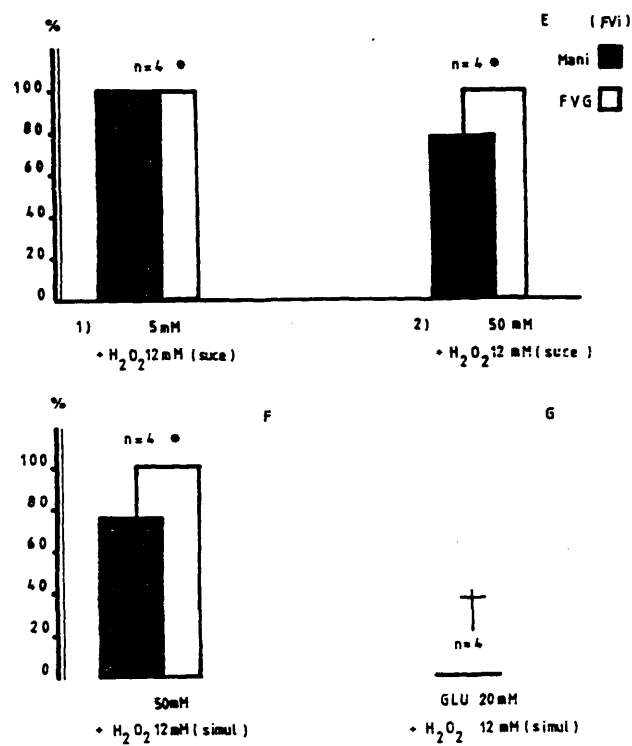


Fig.8. Diagrama de barras representando la incidencia de fibrilación ventricular irreversible (FVi) en relación a la incidencia global de FV - (FVG) en todos los protocolos analizados. (* $p < 0,035$; + $p < 0,012$; ns, p no significativo; v/s = versus). (Para más información, ver - texto)

significativo de los intervalos siguientes frente al control (Tabla 1) (Fig. 9 a): AH ($31,250 \pm 0,555$ ms hasta $52 \pm 8,319$ milisegundos) $p < 0,001$ a los 50 minutos de perfusión. La significación estadística ya estaba establecida a los 30 minutos ($p < 0,025$); QV ($8,109 \pm 0,307$ ms) a ($10,600 \pm 1,077$ ms) $p < 0,025$ a los 30 minutos, invariablemente hasta los 50 minutos de perfusión; AV desde $56,234 \pm 0,761$ ms hasta $79,200 \pm 8,777$ ms y $p < 0,001$. La marcada bradicardia quedó reflejada por el alargamiento de la longitud de ciclo (LC) de $268,431 \pm 7,339$ ms a $364,800 \pm 41,481$ ms y $p < 0,001$ a los 50 minutos de perfusión. El intervalo QT también se alargó significativamente: $43,308 \pm 0,887$ ms hasta $60 \pm 4,243$ ms y $p < 0,001$. Este grupo de experimentos ($n=5$) finalizó en FVi a los $60,5 \pm 2,101$ min. (Tabla 3) seguido de RA como ya se vió (Fig. 6).

Con H_2O_2 (5,9 mM) el tiempo medio de aparición de FVi fue de $35,33 \pm 8,819$ min (Tabla 3). Se pudo observar alargamiento significativo del intervalo AH hasta $42 \pm 6,429$ ms frente al control, $p < 0,001$ a los 30 minutos; del espacio HQ ($16,875 \pm 0,455$ ms. a $24 \pm 2,309$ ms y $p < 0,001$ a los 30 minutos; intervalo QV hasta 12 ± 4 ms. ($p < 0,015$) a los 30 minutos; HV ($24,984 \pm 0,517$ ms hasta $36 \pm 4,619$ ms y $p < 0,001$) al final de la perfusión; intervalo AV ($56,234 \pm 0,761$ ms hasta $78 \pm 6,429$ ms. y $p < 0,001$) también a los 30 minutos. Igualmente, se registró marcada bradicardia con incremento del ciclo ventricular de $268,431 \pm 7,339$ ms. hasta $352 \pm 49,207$ ms y $p < 0,001$ desde los primeros 5 minutos de perfusión, llegando a los 30 minutos a $484 \pm 61,232$ ms ($p < 0,001$). El alargamiento del intervalo QT se presentó

también precozmente desde los primeros 10 minutos de perfusión ($43,308 \pm 0,887$ ms) hasta $52,5 \pm 1,258$ ms, $p < 0,015$) aumentando la significación estadística ya a los 20 minutos ($58 \pm 2,994$ ms y $p < 0,001$), siguiendo el incremento hasta los 30 minutos ($59,333 \pm 4,667$ ms) (Fig. 9 b) respecto al control (Tabla. 1).

Con H_2O_2 29 mM además de reducirse significativamente la duración de los efectos de la substancia a $11,80 \pm 1,113$ min. ($p < 0,001$) frente a las concentraciones inferiores (Tabla 3) quedan afectados solo los intervalos AH, AV, y LC que se alargaron también significativamente. (Fig. 9 d). Aquí hubo más bien disminución del espacio QT a $41 \pm 2,517$ ms aunque no significativo. Recordemos que en el contexto de este trabajo no se aplicó la fórmula de Bazett del QTc. Los valores hallados fueron : AH $36 \pm 1,265$ ms desde los primeros 5 minutos de perfusión ($p < 0,025$) hasta $38 \pm 1,155$ ms ($p < 0,001$) respecto al control; AV $62 \pm 2,098$ ms ($p < 0,025$) a los 5 minutos de perfusión, llegando a acentuarse la significación ($p < 0,001$) a los 10 minutos ($64,500 \pm 1,708$ ms). La LC presentó una $p < 0,025$ a los 10 minutos ($342 \pm 61,373$ ms) recalcando así la bradicardia manifiesta. Los valores citados se comparan con los controles. (Tabla 1) (Fig. 9 d).

Con H_2O_2 12 mM, también se acortó significativamente el tiempo total de perfusión, reduciéndose a $13,60 \pm 1,122$ minutos frente a las series de 5,9 mM y 2,9mM ($p < 0,001$) (Tabla 3) con aparición de FV irreversible en el 83,33% de los casos ($n=6$) (Fig. 8 a). A la vez, hay que subrayar el comportamiento peculiar de todas las variables

	PA	AH	HQ	QV	HV	AV	LC	QT
#	7.563	31.250	16.875	8.109	24.984	56.234	268.431	43.308
##	0.280	0.555	0.455	0.307	0.517	0.761	7.339	0.887

Media aritmética
 ## \pm SEM n= 80

Tabla 1: Valores "control" de los parámetros del Histograma
 Expresados como la media aritmética \pm SEM

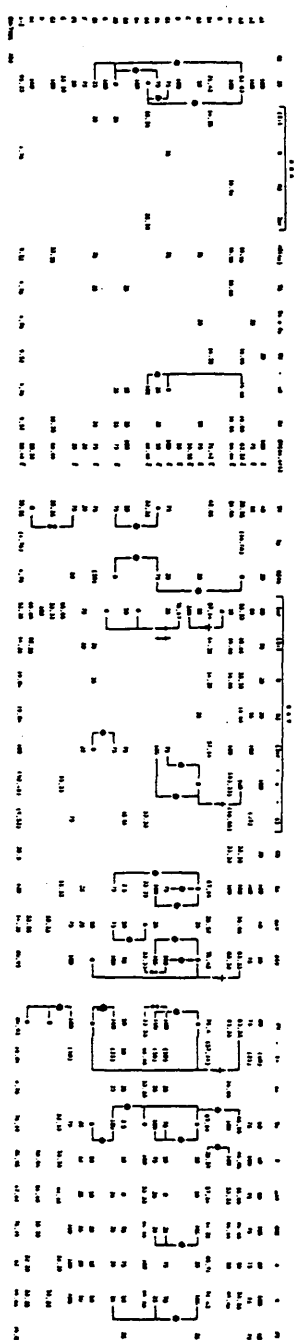


Table-2. Incidencia general de las arritmias.
 A_1-A_4 (H_2O_2 2,5 : 5,9 : 12 : 29 mM) ; B (DMSO 10^{-3} M) ; B_1 (DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM sucesivamente) ;
 B_2 (DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM sucesivamente) ; C (Montol 5 mM) ; D (Montol 50 mM) ; C_1 (Montol 5 mM
y H_2O_2 12 mM sucesivamente) ; D_1 (Montol 50 mM y H_2O_2 12 mM sucesivamente) ; B_3 (DMSO 10^{-3} M y H_2O_2
12 mM simultáneamente) ; B_4 (DMSO 10^{-2} M) ; B_5 (DMSO 10^{-2} M y H_2O_2 12 mM simultáneamente) ; D_2 (Montol
50 mM y H_2O_2 12 mM simultáneamente) ; E (Glucosa 20 mM) ; E_1 (Glucosa 20 mM y H_2O_2 12 mM simultá-
neamente) ; $F-F_1$ (10 10 minutos y Rep) ; $G-G_1$ (10 5 minutos y Rep) ; $H-H_1$ (10 3 minutos y Rep) ; A-King
ciencia global para H_2O_2 indistintamente de las moléculas) ; Control.

* $p < 0,035$; ** $p < 0,05$. Resto símbolos igual que Table 3.

	Inicio Arritmias	Inicio FV	Recuperación	PT
H₂O₂ aislado				
(n=6) 2,9 mM	40,00 ± 5,830	60,50 ± 2,101	—	44,66 ± 4,52
(n=4) 5,9 mM	22,75 ± 3,434	35,33 ± 8,819	—	35,00 ± 2,89
(n=6) 12 mM	7,66 ± 0,838	13,60 ± 1,122	—	—
(n=6) 29 mM	7,33 ± 0,871	11,80 ± 1,113	—	—
DMSO aislado				
(n=18) 10 ⁻³ M	ns	ns	—	—
(n=4) 10 ⁻² M	ns	—	—	—
DMSO (suco)				
a. (n=7) 10 ⁻³ M	—	—	—	—
y H ₂ O ₂ 29 mM	8,71 ± 0,892	11,85 ± 1,142	2,50 ± 0,50	—
b. (n=4) 10 ⁻³ M	ns	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	7,66 ± 1,452	—	—	35,00
Manitol aislado				
(n=9) 5 mM	18,00 ± 3,741	—	—	—
(n=14) 50 mM	17,00 ± 3,684	—	—	—
Manitol (suco)				
a. (n=4) 5 mM	—	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	5,25 ± 1,314	13,75 ± 0,75	—	—
b. (n=4) 50 mM	—	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	10,66 ± 2,333	21,00 ± 2,155	1 (< 1)	—
DMSO (simul)				
a. (n=3) 10 ⁻³ M	—	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	12,66 ± 1,452	21,00	60 s	—
b. (n=4) 10 ⁻² M	—	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	10,25 ± 2,393	19,00 ± 2,309	30 s	15,00
Manitol (simul)				
(n=4) 50 mM	ns	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	7,75 ± 1,493	10,75 ± 1,101	3 (< 2)	—
Glucosa aislado				
a. (n=4) 20 mM	ns	—	—	—
b. (n=4) (simul)	—	—	—	—
y H ₂ O ₂ 12 mM	12,75 ± 3,037	—	—	—
IG y Reperusión				
10 (< 10)	1,50 ± 0,288	6,25 ± 1,138	—	—
5 (60)	1,00	—	—	—
3 (60)	3,00	—	—	—

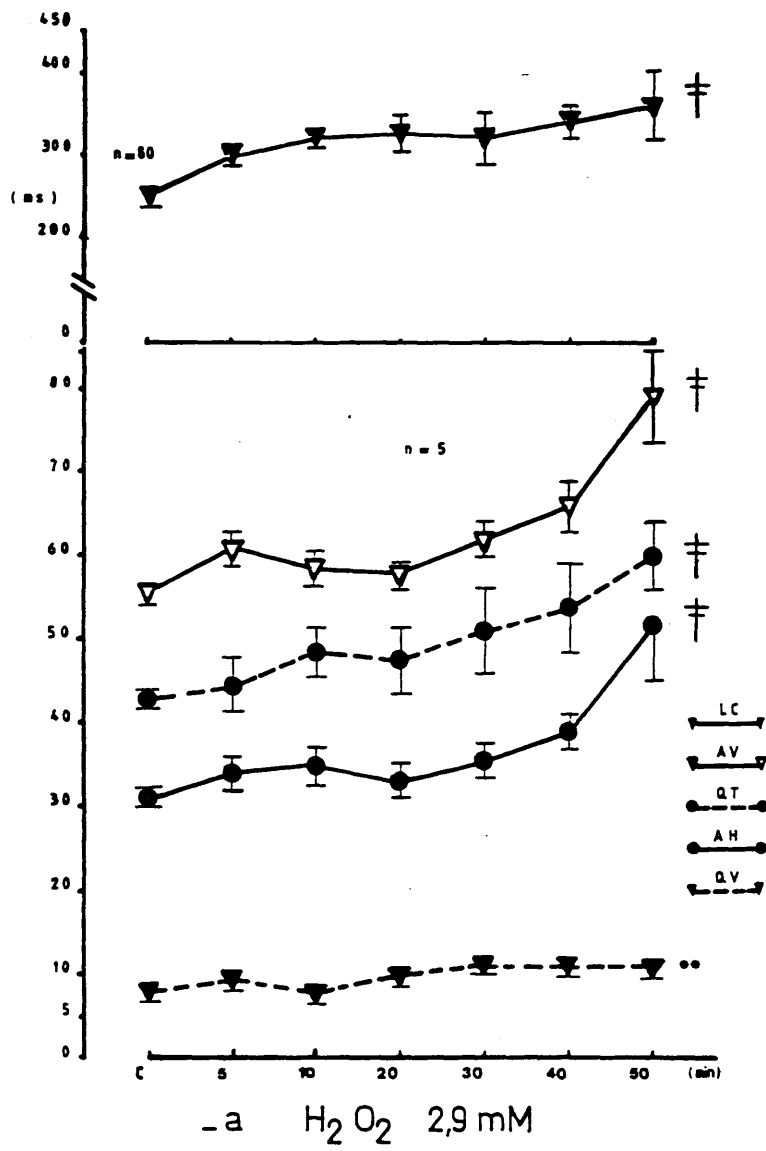
Tabla-3 Relación en el tiempo de presentación de las arritmias y FV. En los protocolos de IG y Rep., la columna de la izquierda refleja el tiempo de IG, y a la derecha figura el tiempo de reperfusión correspondiente. Las cifras entre paréntesis en la columna Recuperación representan el tiempo que se mantiene el RS. El "tiempo" se expresa en minutos \pm SEM y en segundos (s). (\dagger $p < 0,001$; $\dagger\dagger$ $p < 0,005$; \ddagger $p < 0,012$; triángulos, $p < 0,015$; ** $p < 0,025$; ∞ $p < 0,050$; ns (no significativo).

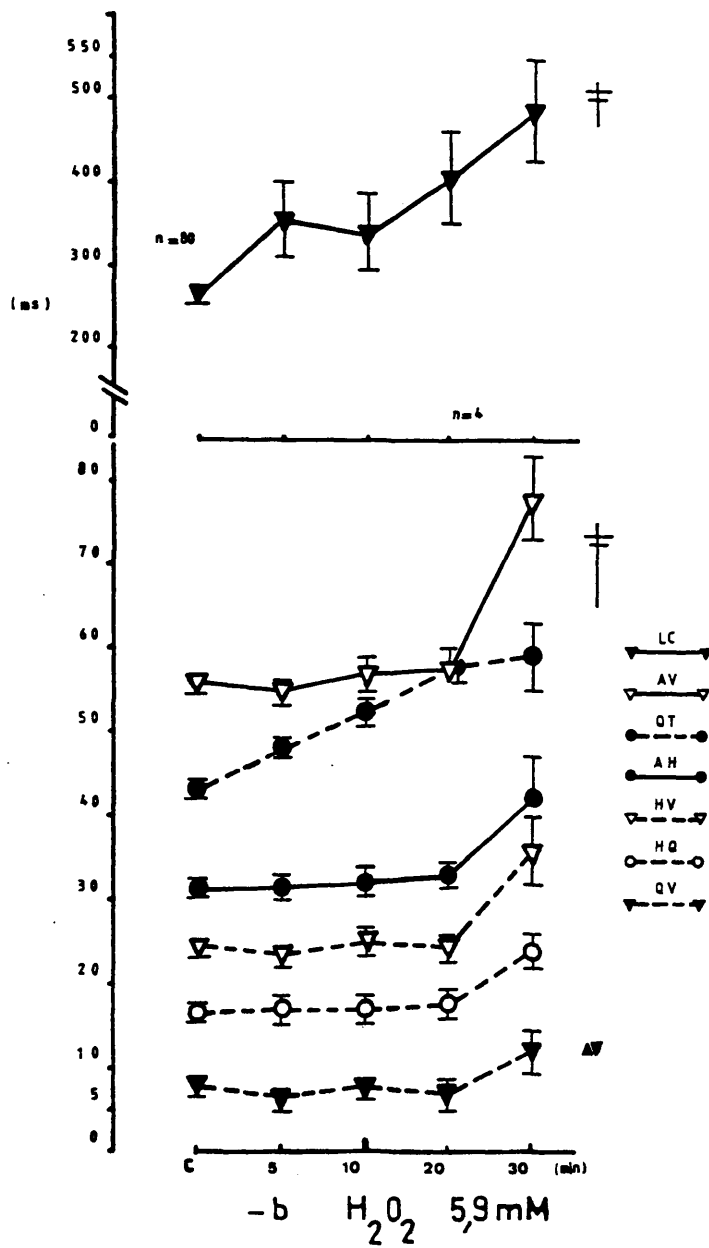
medidas anteriormente; siendo la tendencia global, la disminución de los intervalos AH, AV, QT, HQ, QV, HV y PA, no significativo (ns) (Fig. 9-c). Una similitud de comportamiento podría establecerse con las series de 2,9 mM y 5,9 mM donde los intervalos AH, QV y AV se mantuvieron en valores rozando el control durante los primeros 20 minutos de perfusión, aunque para volver a alargarse significativamente hasta el final del experimento (Figs. 9 a y b).

También es interesante señalar que persistió la respuesta bradicárdica, alargándose la LC a $362,667 \pm 60,853$ ms ($p < 0,015$) respecto al control (Fig. 9 c).

Distribuyendo las diferentes concentraciones de H_2O_2 y los efectos conseguidos sobre el intervalo AH en un sistema de coordenadas, fijando en 10 minutos el tiempo de análisis, y utilizando una escala semilogarítmica, se pudo observar un leve ascenso a la molaridad de 2,9 mM $34,800 \pm 2,154$ ms. ($p = 1s$), iniciándose en este punto un acortamiento mantenido $32 \pm 1,633$ ms ($p = ns$) (5,9 mM) hasta los 12 mM $29 \pm 3,512$ ms ($p = ns$), llegando a niveles control. A partir de este momento la curva presenta una pendiente muy marcada hasta llegar a la mayor concentración utilizada (29 mM) $38 \pm 1,155$ ms ($p < 0,001$) respecto al control como los otros valores de la gráfica. (Fig. 10).

Este hecho una vez más, nos pone de relieve el comportamiento peculiar del peróxido de hidrógeno a la concentración de 12 mM, el único que tiende a acortar la mayoría de parámetros del hisiograma





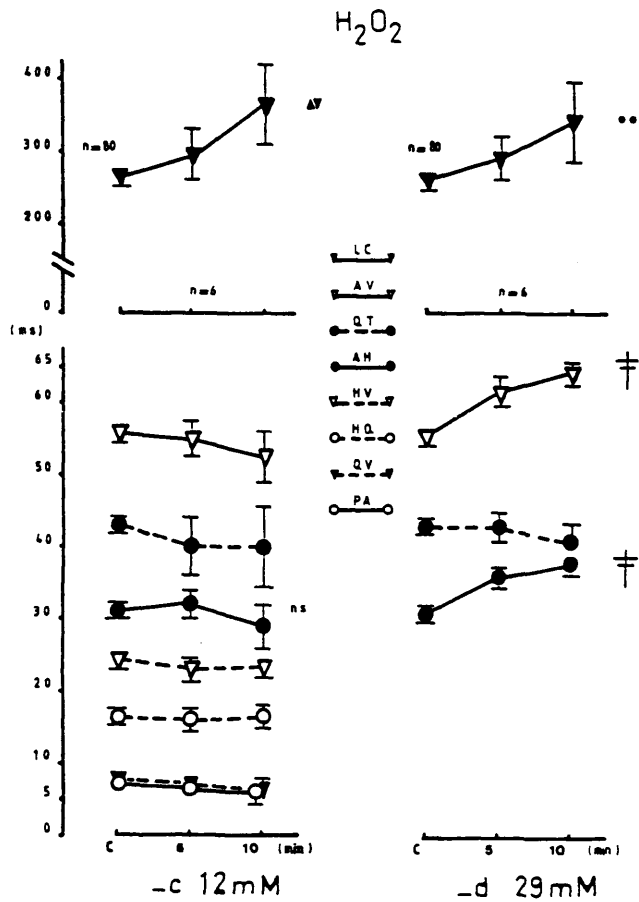


Fig.9. Gráfica mostrando las variaciones de los parámetros del histograma - con H_2O_2 perfundido aisladamente a diferentes concentraciones. Los intervalos que no sufren modificación alguna no se representan. En - abscisas figura el tiempo de perfusión en minutos (min) y en ordenadas, el efecto observado en milisegundos (ms). (Nótese la diferente escala de la abscisa a partir de los 10 minutos para las molaridades de 2,9 mM y 5,9 mM). ** $p < 0,025$; triángulos, $p < 0,015$; † $p < 0,001$; ns, p no significativo. Se representa el error estándar \pm SEM de la media. (Más amplia información en el texto)

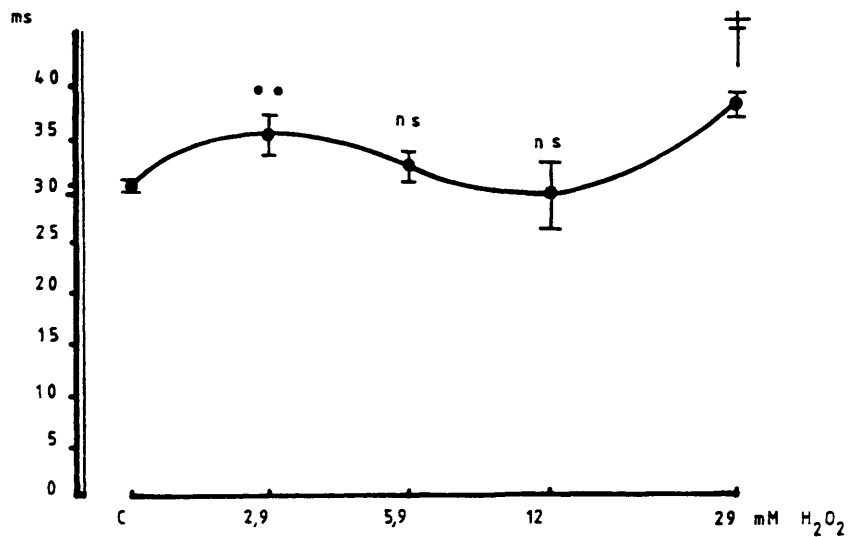
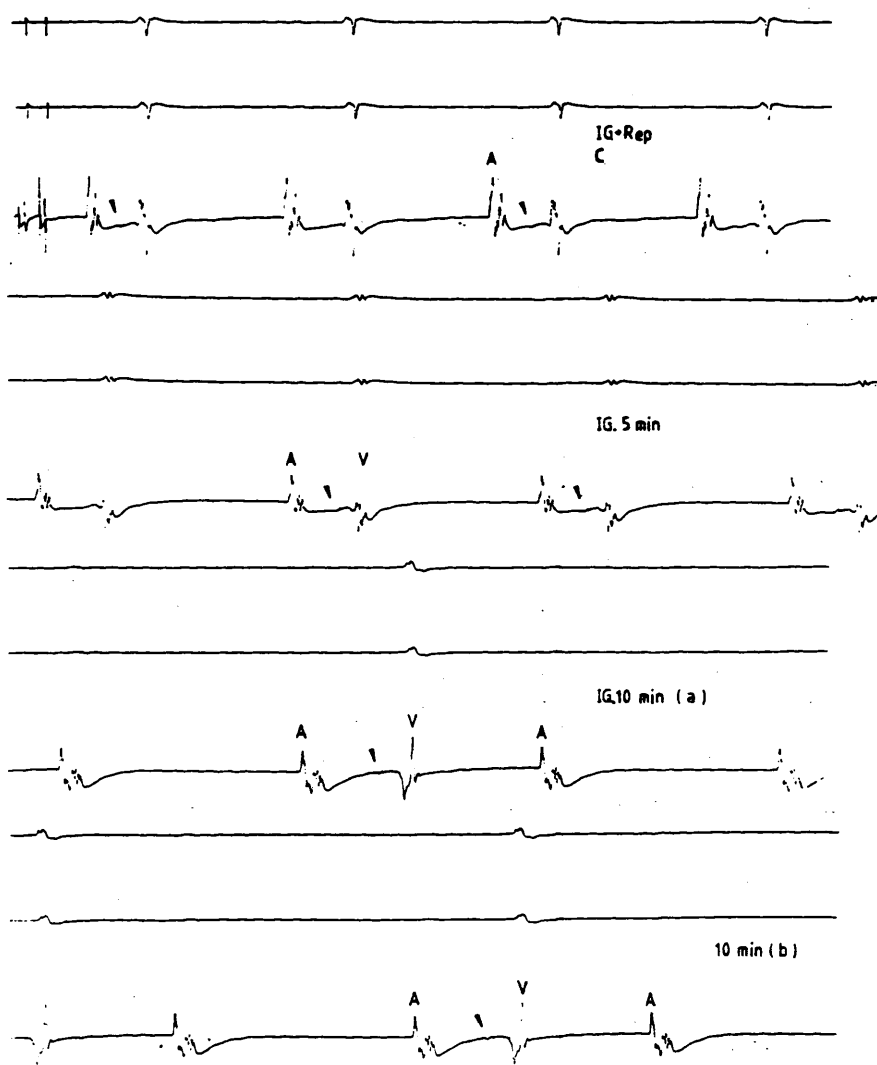
VARIACIONES INT. AH con H_2O_2 — 10 min PERFUSION

Fig.10. Curva en escala semilogarítmica de los efectos sobre el intervalo AH en milisegundos (ms) (ordenadas) de H_2O_2 a diferentes concentraciones (mM) (abscisas). Están representados los valores alcanzados a los 10 minutos como tiempo límite para todas las molaridades, por haberse presentado FVi con 12 mM y 29 mM antes de completar los 15 minutos de perfusión. Se representa el error estándar de la media \pm SEM. (•• $p = 1s$, límite de la significación; † $p < 0,001$; ns, p no significativo). (Más información en el texto)

a pesar de desencadenar también FVi, incluso más bien precoz ($13,60 \pm 1,122$ minutos) como ya veíamos. Así pues se vislumbran otros factores determinantes en la aparición o no de FV, aparte de trastornos de la conducción y automatismo. Queremos con ello apuntar hacia los procesos químicos relacionados con el metabolismo del H_2O_2 y especies oxigenadas hiperactivas como el $O_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot} .

PROTOCOLO DE IG Y REPERFUSION

De los 10 experimentos de isquemia global (IG) y reperfusión, se llegó a FVi en el 100% del grupo sometido a 10 min. de isquemia global ($n=4$) al restablecerse el flujo miocárdico (Fig. 11); mientras se mantuvo el RS durante los 60 minutos de reperfusión en la totalidad de los corazones mantenidos isquémicos durante 5 ($n=3$) y 3 minutos ($n=3$) ($p < 0,035$) respecto a la serie de IG de 10 min seguido de reperfusión. (Fig. 12) (Fig. 8 b). Es de interés subrayar que el 25% de la serie de los 10 minutos presentó RA con bloqueo nodal completo, al final del período de isquemia y otro 25% disociación auriculo ventricular (DAV). El 33,33% del grupo de los 5 minutos (Tabla 2) presentó también RA y bloqueo nodal. Interesantemente, ninguno de los corazones llegó a fibrilar durante el período de isquemia ($n=10$) ($p < 0,035$) comparado con la reperfusión, independientemente del tiempo de isquemia global considerado. (Fig. 8 b -4). Señalaremos de paso que el 66,66% de los experimentos del grupo de los 5 minutos de isquemia presentó las arritmias severas de los primeros minutos



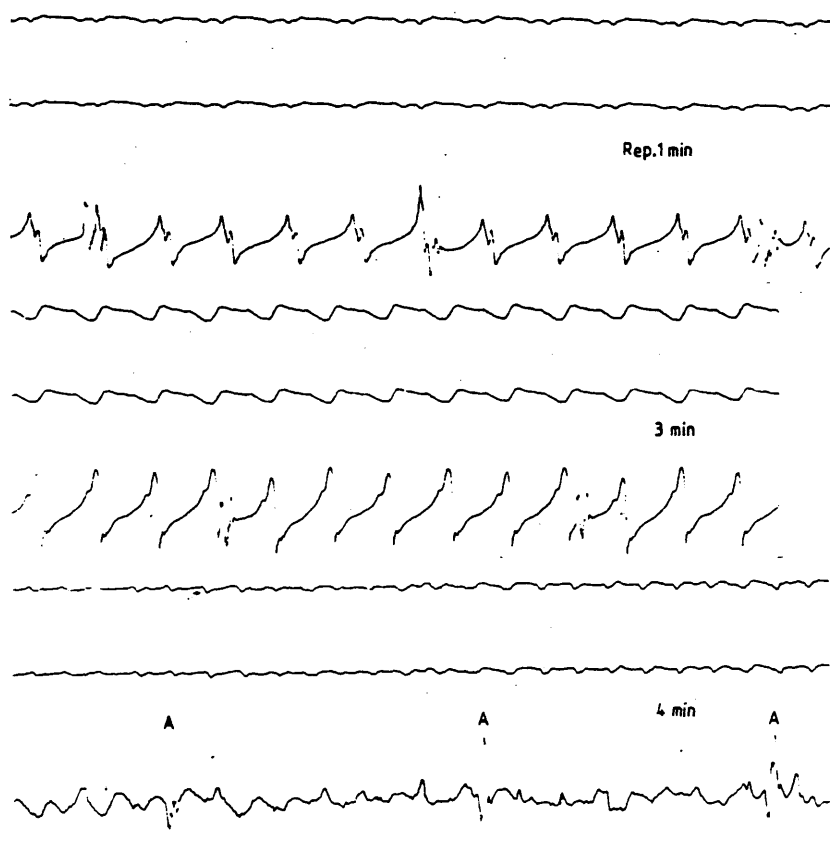
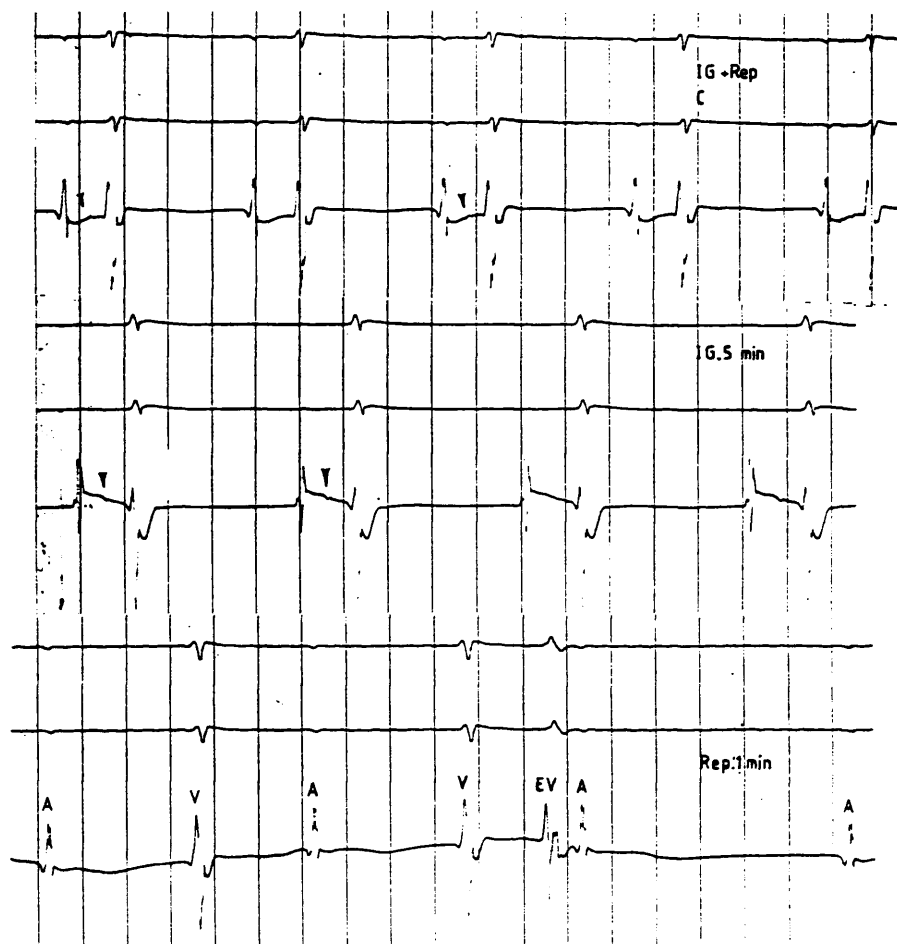


Fig.11. Secuencia de las arritmias observadas en el protocolo de 10 minutos de IG y Rep. Con la IG nótese el alargamiento progresivo del intervalo AH, significativo desde los 5 minutos. Se aprecia el desnivelamiento del "segmento AV" y bloqueo nodal 2:1 a los 10 minutos de IG (trazado continuo en planchas a y b). En el primer minuto de la reperfusión se inicia TV degenerando a fv y FV a los 3 y 4 minutos respectivamente. Símbolos igual que en Fig.6. (Ver texto para más información)



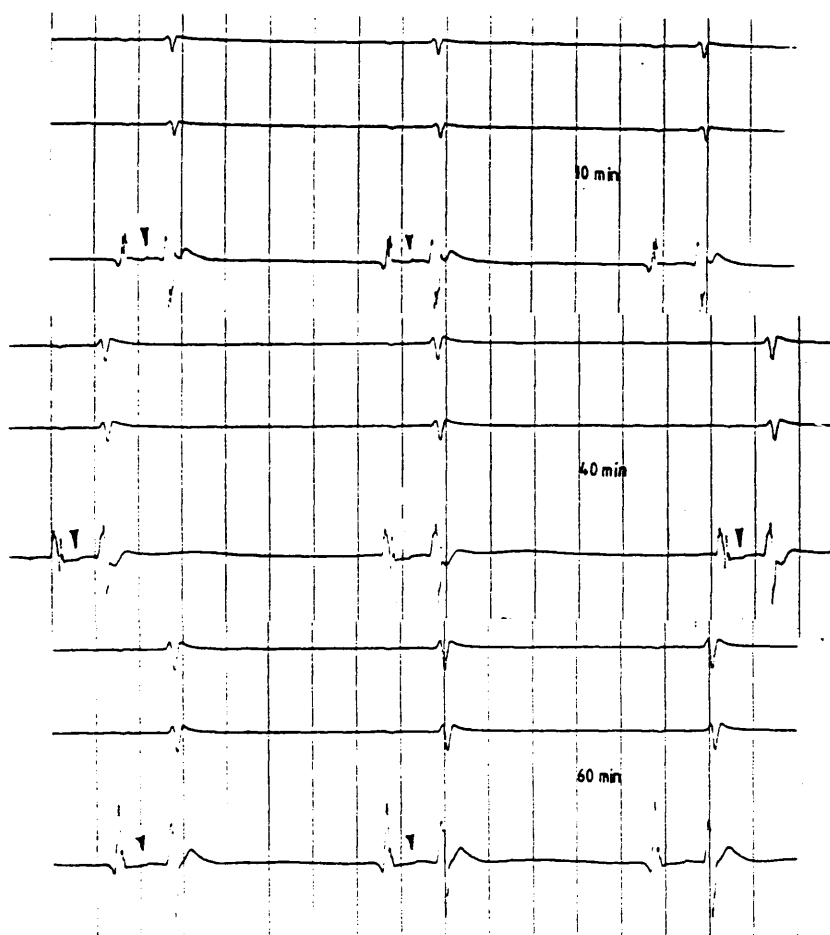
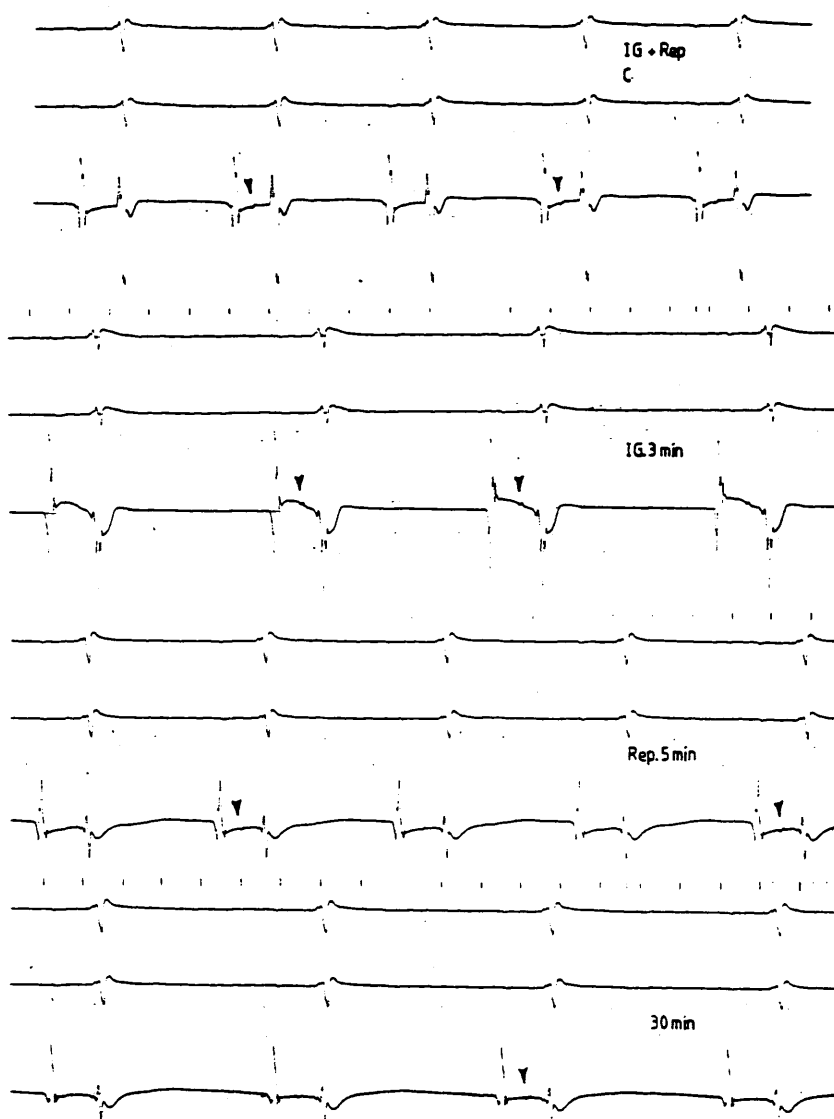


Fig.12-1. Con cinco minutos de IG se puede observar el desnivelamiento del "segmento" AV. El primer minuto de perfusión muestra ya extra-sístolia ventricular (EV) y DAV isorítmica. A partir de los diez minutos, hay recuperación del voltaje del ECG, habiéndose recuperado la conducción auriculoventricular. No surgieron más arritmias hasta completar 60 minutos de perfusión. (Más amplia información en el texto)



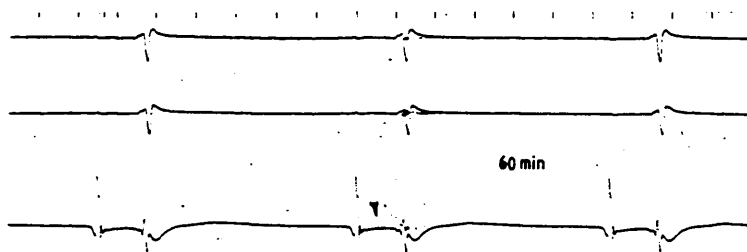


Fig.12-2. Al completarse tres minutos de IG, hay supradesnivelamiento del -
"segmento" AV. Sobresale la baja incidencia de arritmias con la re-
perfusión en este grupo. (Ver texto para más información)

de la reperfusión, comportamiento habitual después de isquemia global de 10 minutos (100% en nuestra casuística). Con tres minutos de isquemia la incidencia global se redujo al 33,33% ($p < 0,050$) comparado con el grupo de los 10 minutos (Fig. 13).

Los cambios electrofisiológicos se manifestaron fundamentalmente a nivel de los intervalos PA, AII, AV, QT y LC.

1.- Diez minutos de IC y reperfusión.

Con diez minutos de IC ($n = 4$) se observó alargamiento del intervalo PA hasta 11 ± 3 ms ($p < 0,001$) respecto al control, pauta seguida en todos los demás parámetros considerados (Tabla 1). AII hasta $44,500 \pm 6,946$ ms ($p < 0,001$); AV hasta $70,750 \pm 8,179$ ms ($p < 0,001$); QT hasta $62,500 \pm 9,215$ ms ($p < 0,001$) y LC hasta $301,500 \pm 34,248$ ms (ns). Estos valores se refieren a los 5 minutos de isquemia global siguiendo el incremento hasta los 10 minutos: AII hasta $54,66 \pm 12,55$ ms; AV hasta $83,33 \pm 15,84$ ms., y LC hasta $404,66 \pm 52,56$ ms. ($p < 0,001$) respecto al control, excepto QT y PA que disminuyeron: $50,66 \pm 12,70$ ms y $8,33 \pm 0,271$ ms respectivamente (ns). Aquí también se registró acción bradicardizante significativa en relación al control (Fig. 14 a).

En este grupo, el 100% entró en l'Vi ($n = 4$) en los primeros minutos

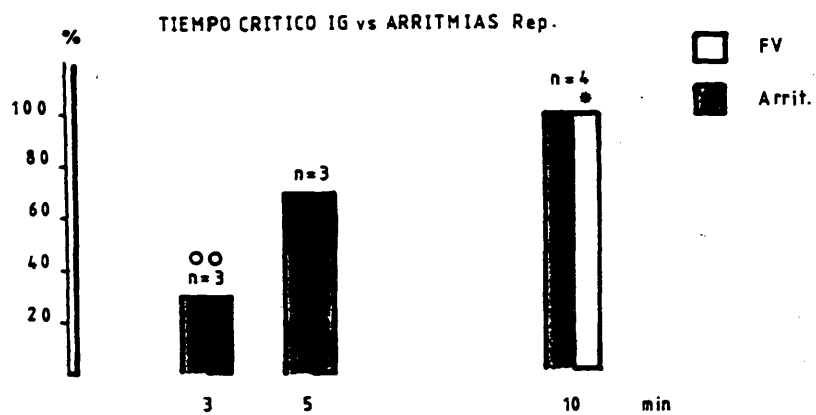


Fig.13. Diagrama de barras relacionando el tiempo de isquemia global (abscisas) y el porcentaje de incidencia de arritmias en general durante la reperfusion (supraventriculares, ventriculares, incluyendo EV aislados) en ordenadas. Se representa simultaneamente la incidencia de FV. (∞ $p < 0,050$; * $p < 0,035$). (Más información en el texto)

de la reperfusión: $6,25 \pm 1,138$ min. (Fig. 8 b-1) (Tabla 3) más precoz incluso que el H_2O_2 perfundido aisladamente e inclusive a las concentraciones más altas 12 mM y 29 mM ($p < 0,015$).

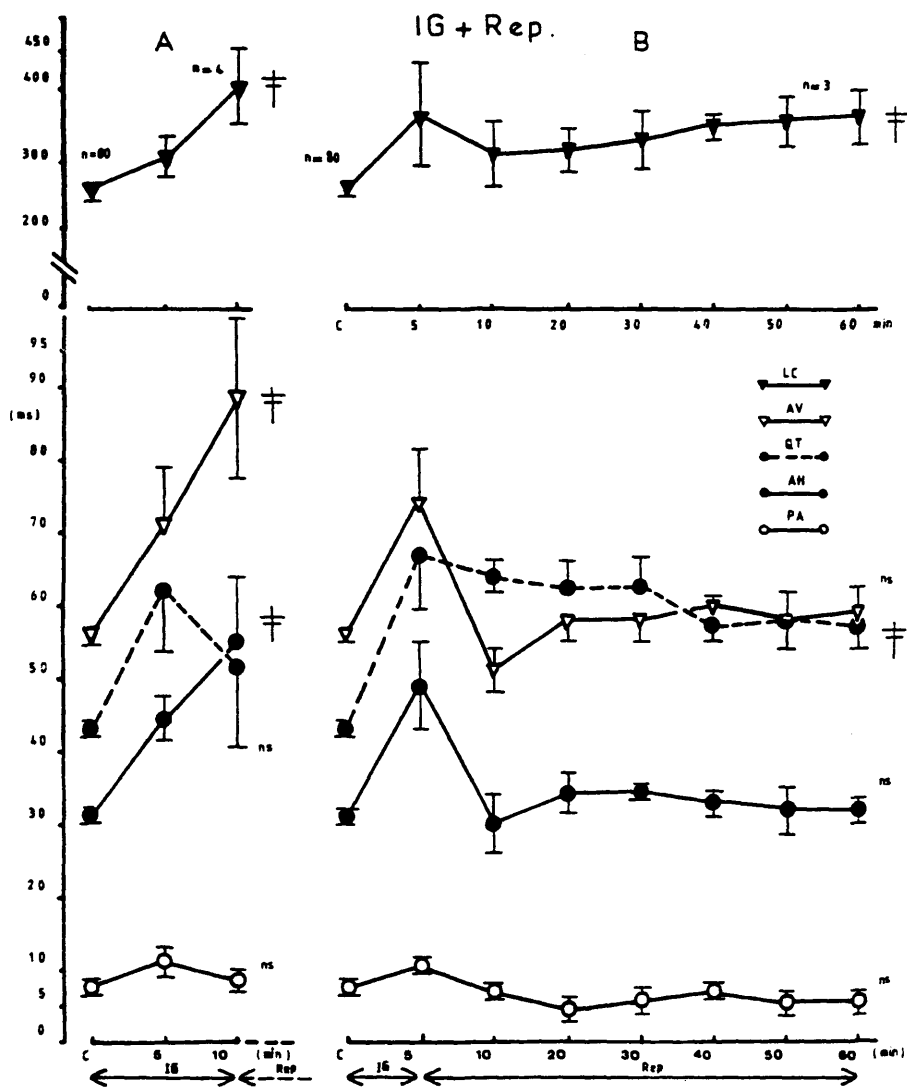
2.- Cinco minutos de IG y reperfusión.

Con cinco minutos de isquemia ($n=3$) sucedió igualmente alargamiento significativo de los intervalos PA, AH, AV, QT, incluyendo la LC. Como ya apuntábamos, el 100% de los experimentos mantuvo el RS durante los 60 minutos de reperfusión (Fig. 12 -1). Queremos hacer hincapié sobre el hecho de que AH incrementó significativamente ($p < 0,001$) a los cinco minutos de isquemia global ($49 \pm 6,361$ ms) respecto al control para luego volver a valores basales a los diez minutos de reperfusión ($30 \pm 4,163$ ms) (Fig. 14 b) (Tabla 1). Se mantuvo así hasta los 60 minutos de reperfusión ($32,667 \pm 1,764$ ms).

Este último dato parece guardar cierta relación con la aparición o ausencia de FV como respuesta terminal a la reperfusión; entre otros factores.

3.- Tres minutos de IG y reperfusión.

En estas condiciones, el intervalo AH pasó de 42 ± 2 ms ($p < 0,001$) frente al control (Tabla 1) al completarse los tres minutos de isquemia, a $36 \pm 2,309$ ms durante los diez primeros minutos de reperfusión, manteniéndose en niveles equiparables durante los 60 minutos siguientes, hecho que se dió también con la reperfusión precedido de 5 minutos de IG. (Fig. 14 -c). Este patrón de comportamiento se extendió asimismo



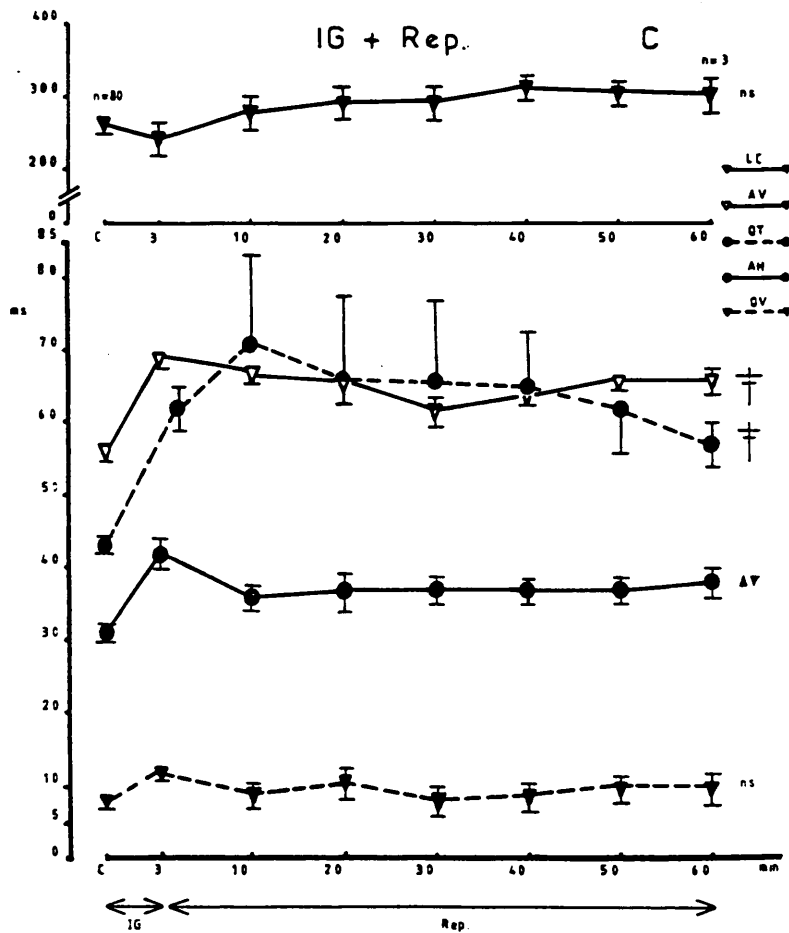


Fig.14. Gráficas ilustrando los efectos de la IG y Rep. sobre los parámetros del hisiograma. En abscisas figura la duración de la IG y Rep. en minutos, y en ordenadas las variaciones de los diferentes intervalos en milisegundos. No se representan los espacios que no sufren ninguna alteración aparente. (Estas observaciones son válidas para las planchas A, B y C). Nótese el valor diferente de la IG en abscisas respecto a la reperusión, planchas B y C. (triángulos representan $p < 0,015$; $\dagger p < 0,001$). (Se amplia la información en el texto)

a los demás parámetros con tendencia general a acortarse al iniciar la reperfusión; fenómeno no observado con el protocolo de los diez minutos de isquemia (Fig. 14 a). Cabe mencionar como excepción el intervalo QT del grupo de los tres minutos que siguió incrementándose durante los primeros diez minutos de reperfusión, hasta $71,333 \pm 16,014$ ms ($p < 0,001$) respecto al control (Tabla 1), aunque volvió a disminuir paulatinamente (Fig. 14 - C), pero manteniendo la significación estadística durante los 60 minutos de reperfusión: $57,333 \pm 5,333$ ms ($p < 0,001$).

Otro dato de interés es la aparición constante de bradicardia en los corazones mantenidos sin riego coronario durante 5 y 3 minutos (100%) puesto que hasta el final del período de reperfusión, la LC siguió con valores superiores al control, incluso con significación en el grupo de los 5 minutos ($370 \pm 40,415$ ms y $p < 0,001$) (Figs. 14 b y c).

Volvemos a insistir sobre el hecho de que en ambas series de los 5 y 3 minutos de isquemia global se mantuvo el RS durante los 60 minutos de reperfusión y no se presentó flutter y/o FV. (Fig. 13). (Fig. 12-1 y 2).

PROTOCOLOS CON DIMETILSULFOXIDO (DMSO) Y H_2O_2

Se realizaron 3 series consecutivas con DMSO, barredor de

radicales OH^\cdot (157), agrupando 22 casos, utilizando las concentraciones de 10^{-3} M y 10^{-2} M; para mejor determinar el lugar de acción de la sustancia a nivel intra o extracelular. Recordemos que unos corazones sirvieron solamente para estudiar los efectos de DMSO aisladamente, mientras que la mayoría valió para analizar a posteriori la respuesta frente a H_2O_2 .

Primera serie.-

1.-El comportamiento general observado con las 18 preparaciones de DMSO 10^{-3} M aisladamente, fue el incremento significativo de los intervalos PA ($9,200 \pm 0,500$ ms y $p < 0,015$); HQ ($19,400 \pm 1,264$ ms y $p < 0,025$); HV ($27,667 \pm 1,337$ ms, $p < 0,025$) y AV ($60 \pm 1,983$ ms, $p < 0,025$) frente a los valores control y a los 30 minutos de reperfusión. No hubo cambios significativos de los intervalos AH, QV, QT y LC aunque la tendencia fue a la bradicardia ($301,600 \pm 15,066$ ms) (ns) recalcando la ausencia de arritmias ventriculares (Fig. 15). (Fig. 16-1 a y a').

2.- Reseñemos también algunas peculiaridades en el comportamiento de DMSO (10^{-2} M) perfundido aisladamente ($n=4$). Sobresale primero el acortamiento del intervalo AH a los 30 minutos de perfusión ($31 \pm 1,915$ ms) (ns) aunque este efecto fue más pronunciado a los 20 minutos ($28 \pm 1,633$ ms) (ns). (Fig. 16 - 1 b). Recordemos que este parámetro quedó inalterado con DMSO 10^{-3} M.

Al contrario, el intervalo AV que presentaba ya significación a esta última concentración, no lo presentó a 10^{-2} M aunque se alargó también a los 30 minutos ($58 \pm 1,826$ ms) (ns). La longitud de ciclo



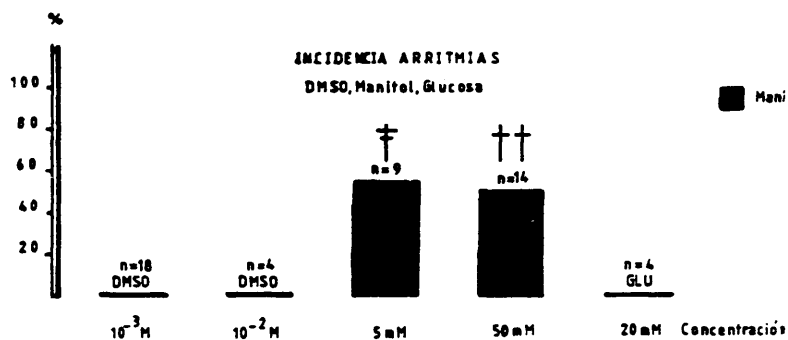


Fig.15. Gráfica de barras demostrando la incidencia de arritmias con DMSO, Manitol y Glucosa perfundidos aisladamente durante 30 minutos. En abscisas se representan las mencionadas sustancias a las diferentes concentraciones utilizadas, y en ordenadas corresponden los porcentajes de las arritmias. († $p < 0,001$; †† $p < 0,005$). Más información en el texto.

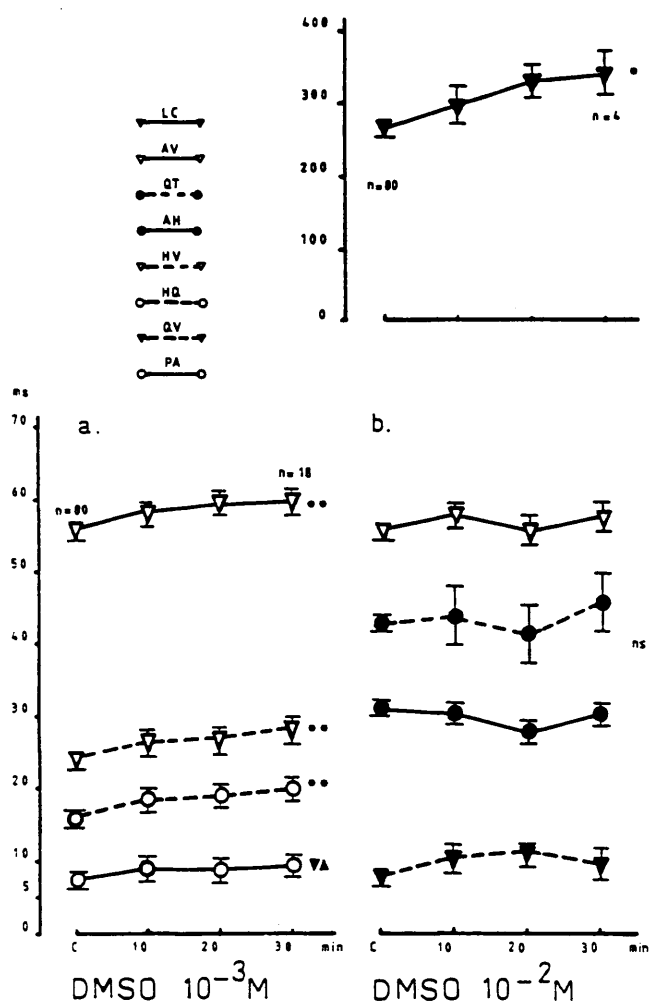
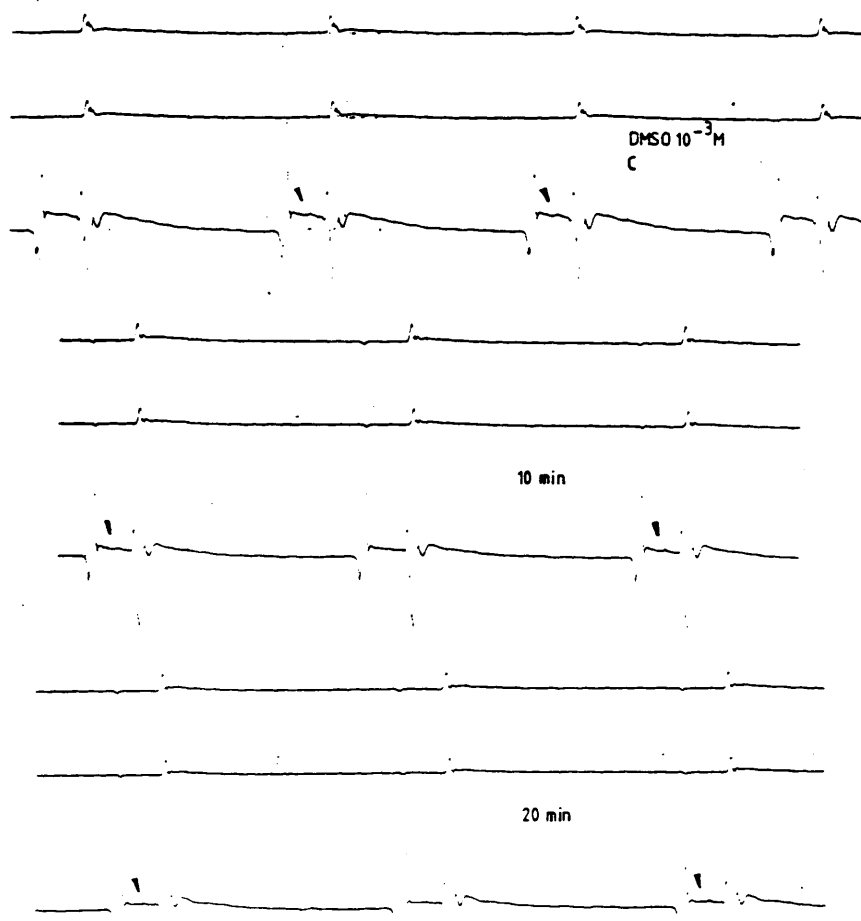


Fig.16-1. Efectos de DMSO perfundido aisladamente durante 30 minutos, sobre los parámetros del Histiograma. Plancha-a para la molaridad de 10⁻³ M y plancha-b para 10⁻² M. (** p < 0,025; triángulos representan la p < 0,015; ns = no significativo). (Más información en el texto)



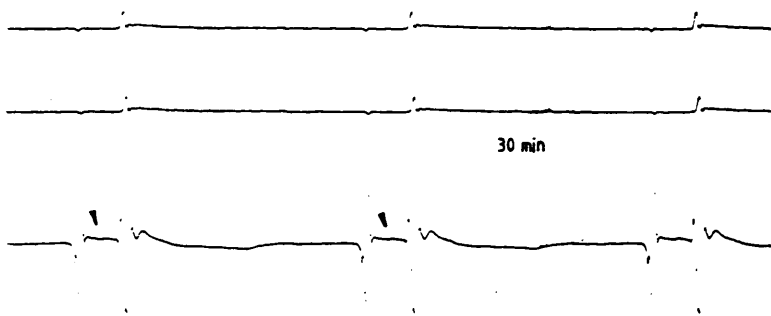
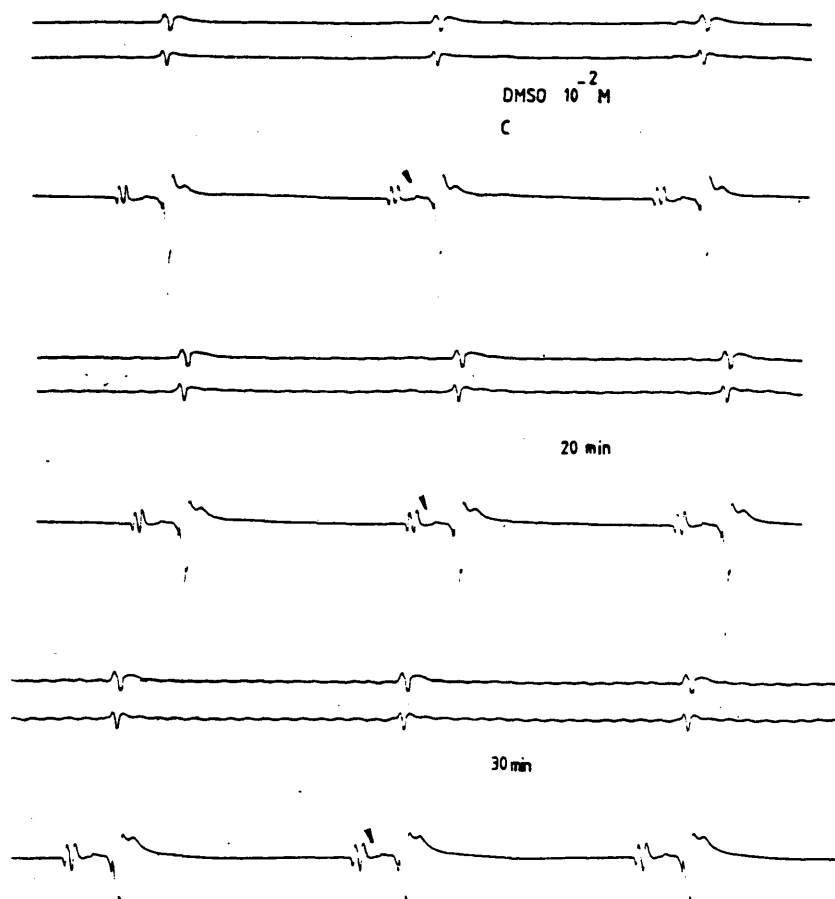


Fig.16-1. Las secuencias de la plancha-a' demuestran la ausencia de trastornos del ritmo y de la conducción durante 30 minutos de DMSO 10^{-3} M perfundido aisladamente.



7.16-1. Las secuencias de la plancha-b' permiten comprobar la ausencia de disturbios del ritmo y de la conducción con DMSO 10^{-2} M perfundido aisladamente durante 30 minutos. (Se puede observar la interferencia eléctrica ambiental a los 20 y 30 minutos)

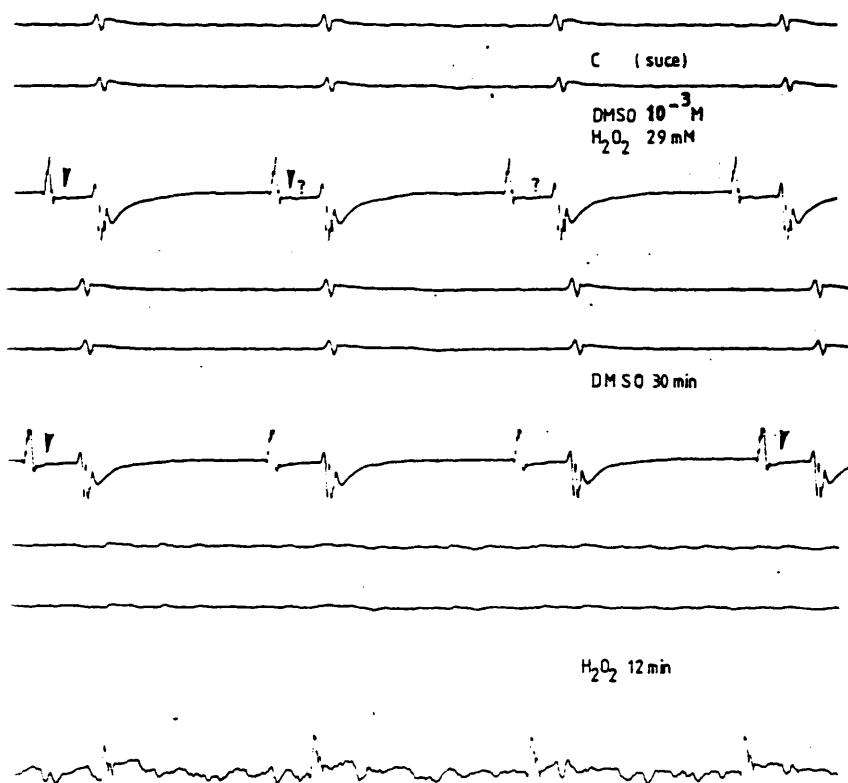
y QT tampoco se vieron modificados con 10^{-3} M pero sí con 10^{-2} M aunque solo el efecto bradicardizante fue significativo: QT ($46 \pm 3,830$ ms, ns) y LC ($340 \pm 32,125$ ms, $p < 0,025$), confrontados con valores control. (Tabla 1). Los espacios PA, HQ, HV no sufrieron ninguna alteración llamativa con 10^{-2} M, habiéndose incrementado significativamente con 10^{-3} M como bien se recordará (Fig. 16 - 1a). El intervalo QV se alargó marcadamente a los 20 minutos de DMSO 10^{-2} M ($11,500 \pm 1,708$ ms, $p < 0,001$), pero a los 30 minutos quedó sin significación ($10 \pm 2,160$ ms) (ns), además de la tendencia a acortarse.

No se registró ninguna arritmia con DMSO perfundido aisladamente durante 30 minutos a ninguna de las dos concentraciones analizadas: 10^{-3} M (Fig. 15) y 10^{-2} M (Fig. 16 - 1a' y b').

Las respuestas cambiaron radicalmente en presencia de H_2O_2 :

Segunda serie.-

1.- Al añadir H_2O_2 (29 mM) (n=7) una vez finalizados los 30 minutos de DMSO 10^{-3} M se alargó llamativamente el AH ($46,400 \pm 3,970$ ms, $p < 0,001$) (Fig. 16 2a) durante los primeros diez minutos, de manera equiparable a lo ocurrido con H_2O_2 aislado a la misma concentración (Fig. 9 d). También aumentó significativamente el intervalo AV ($73,200 \pm 4,716$ ms, $p < 0,001$). El 100% presentó FV en un promedio de $11,857 \pm 1,142$ min, recuperando la actividad sinusal y CAV ----- el 28,57% en un promedio de $2,5 \pm 0,50$ min. (Tabla 3.). Esto demuestra ya protección miocárdica por el DMSO frente a tan alta concentración de H_2O_2 (Fig. 8 c-1 y 16 -2a').



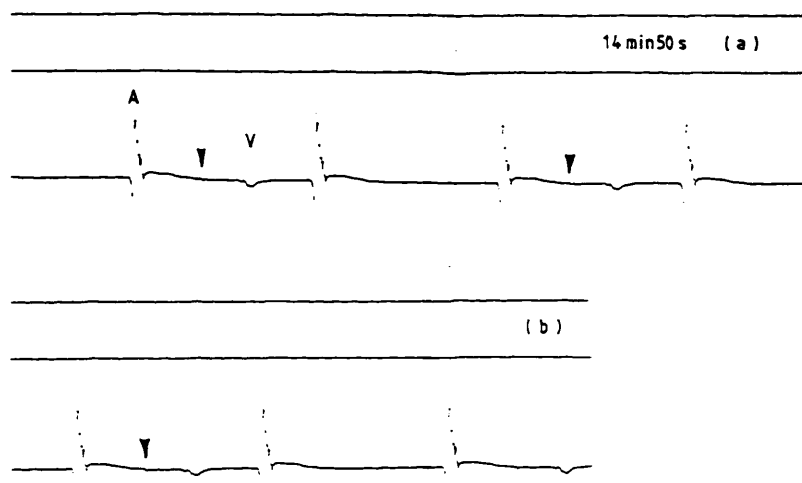


Fig.16-2. La plancha-a' demuestra como la preparaci3n entra en FV a los 12 minutos de haber a~adido H_2O_2 29 mM una vez concluidos 30 minutos de perfusi3n con $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M}$, recuperando el RS en menos de 3 minutos, con conducci3n 2:1. N3tese el intervalo AH en los l3mites bajos de la normalidad, y el aparente alargamiento de HV, debido a la inestabilidad de la se~al del His en esta preparaci3n. Se se~ala con ? lo que probablemente representa otra espiga hisiana. S3mbolos con igual significado que Figs. anteriores. (sucesivo protocolo de perfusi3n sucesiva de ambas sustancias). El trazado a los 14 min 50 s es continuo.

2.- Cuando se añadió H_2O_2 (12 mM) después de DMSO $10^{-3}M$, se registró una mayor duración de los espacios HQ ($28,667 \pm 4,667$ ms, $p < 0,001$); HV ($36,667 \pm 5,969$ ms, $p < 0,001$); AV ($85,333 \pm 15,506$ ms, $p < 0,001$) y AH ($48,667 \pm 9,821$ ms, $p < 0,001$) (Fig. 16 - 2b). Sobresalió la ausencia de FV en los 30 minutos de perfusión correspondientes al protocolo. Este hecho refuerza la evidencia del efecto protector de DMSO $10^{-3}M$ en el corazón aislado de la rata frente a H_2O_2 12 mM con significación estadística (Fig. 8 c-2) $p < 0,012$ respecto a H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente (Fig. 16-2 b*).

Recuerdese que H_2O_2 12 mM aislado mostró tendencia a acortar el AH (ns) y FVi en el 83,33% de la población correspondiente ($n=6$) (Figs. 8-a ; 9-c; 6-g). Además también la longitud de ciclo se alargó significativamente con H_2O_2 12 mM aislado, fenómeno ausente al perfundir con DMSO y H_2O_2 sucesivamente. (Fig. 9-c y 16-2b).

Tercera serie.-

En la serie paralela ($n=7$) (Fig. 5-d) se perfundió con DMSO $10^{-3}M$ o $10^{-2}M$ a todo lo largo del proceso; primero aisladamente durante 30 minutos (efectos descritos anteriormente) añadiendo luego H_2O_2 a la concentración deseada, prosiguiendo tal y como se expuso en su momento.

1.- En un primer ensayo ($n=3$) se confrontaron los efectos de las mismas concentraciones de DMSO y H_2O_2 : $10^{-3}M$ y 12 mM respectivamente. Una vez más, el patrón general de respuestas se modificó sustancialmente. Primero, llamó la atención la disminución significativa de AH a los

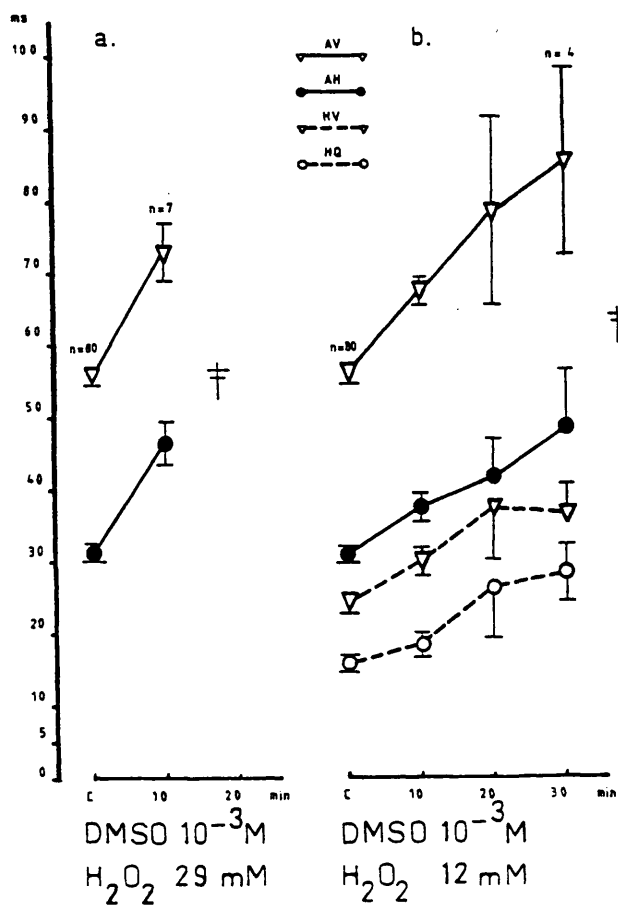


Fig.16-2 La plancha-a muestra las alteraciones de los parámetros del Hsio grana con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM perfundidos sucesivamente (aurel). La plancha-b demuestra estos mismos efectos siguiendo un protocolo similar, pero con H_2O_2 12 mM. († $p < 0,001$ en todos los intervalos analizados). (Más amplia información en el texto)

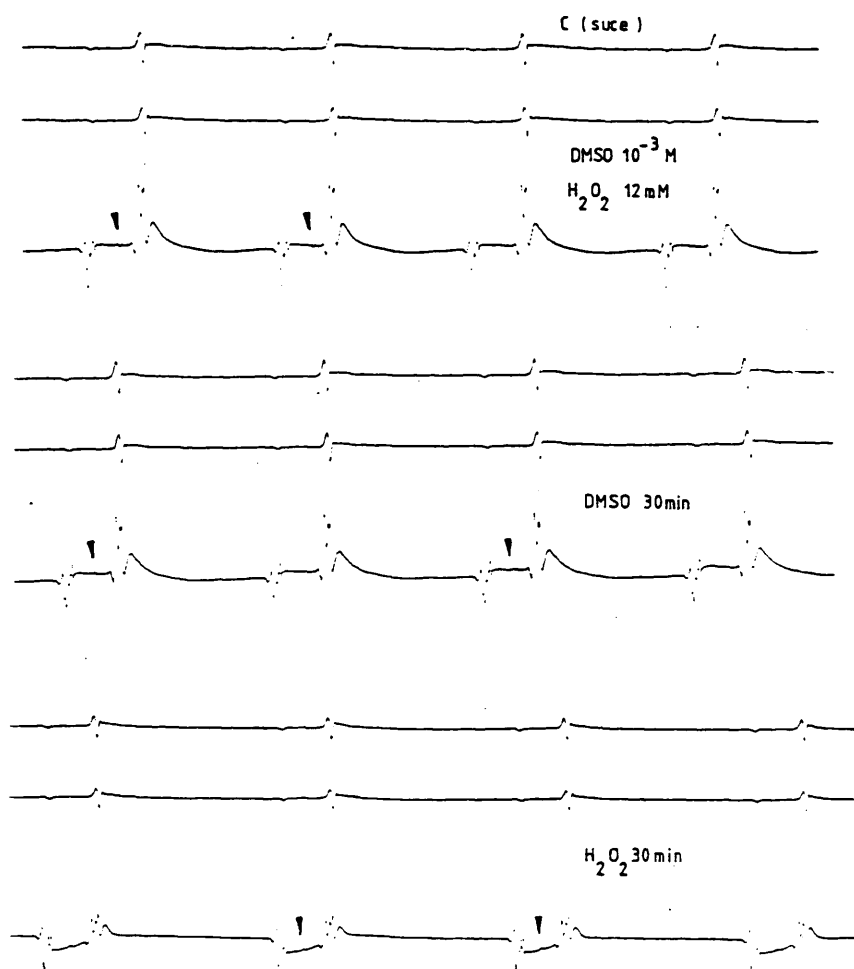


Fig.16-2. En la plancha-b' queda evidente la total protección prestada por DMSO 10^{-3} M frente a H_2O_2 12 mM (protocolo de perfusión sucesiva "suce" de ambas sustancias). Se puede apreciar el cambio de voltaje del ECG y electrograma ventricular, con desnivelamiento del "segmento" AV. La preparación no presentó fv y/o FV a los 30 minutos de haber añadido H_2O_2 y el intervalo AH se acortó. Significación símbolos, ya visto. (La información se amplia en el texto)

diez minutos de perfusión con la mezcla DMSO/H₂O₂ ($26 \pm 3,055$ ms, - $p < 0,025$ en relación al control (Fig. 16-3a). Disminuyó también significativamente AV ($52 \pm 4,163$ ms, $p < 0,001$). Al contrario, aumentaron los valores de PA ($10,667 \pm 1,333$ ms, $p < 0,025$); QT ($61,333 \pm 14,111$ ms, $p < 0,001$) y LC ($333,333 \pm 15,377$ ms, ns), parámetros no afectados cuando se perfundió con DMSO y H₂O₂ sucesivamente (Fig. 16-2b). Otro fenómeno relevante es la aparición de FV en el 33,33% (n=3) pero reversible en su totalidad. La FV se desencadenó a los 21 minutos, llamativamente más tardío que cuando se perfundió con H₂O₂ (12 mM) aisladamente, y además, recuperando el RS en un lapso de 60 segundos demostrando también protección frente a H₂O₂ (Fig. 16-3a'). Se presentó flutter ventricular aisladamente en el 66,66% de las preparaciones (n=3) (Tabla 2) desapareciendo en un minuto. En este sentido, se redujo el curso de estos experimentos en un 33% comparando con el grupo anterior de DMSO y H₂O₂ perfundidos sucesivamente, a las mismas concentraciones en el que, como bien recordaremos, no se desencadenó flutter ni FV durante los 30 minutos de observación.

2.- En un segundo ensayo (n=4) se aumentó la concentración de DMSO a 10^{-2} M manteniendo el H₂O₂ (12mM). (Fig. 8 d-2).

En esta serie comparativa (Fig. 5-d) (n=4) la diferencia fundamental fue el haberse desencadenado FV en el 50% de los casos (n=4) en un promedio de $19 \pm 2,309$ min. recuperándose el 25% en 30 segundos (Tabla 3). (Fig. 8 d-2); y en 33,33% (n=3) con total recuperación en el grupo de DMSO 10^{-3} M y H₂O₂ 12 mM (Fig. 8 d-1). Recordar la incidencia nula de FV cuando se perfundieron DMSO 10^{-3} M y H₂O₂ 12 mM sucesivamente (Fig. 8 - c2). Ya se analizará lo que parece ser una respuesta menos

favorable de DMSO perfundido ininterrumpidamente con H_2O_2 12 mM.

En cuanto a los parámetros intracavitarios, con DMSO 10^{-2} M y H_2O_2 12 mM mantenidos conjuntamente en circuito: AH midió $41,500 \pm 6,898$ ms, $p < 0,001$ a los 20 minutos, y de igual modo HV ($34,250 \pm 4,589$ ms, $p < 0,001$); AV ($75,750 \pm 11,390$ ms, $p < 0,001$). Respecto al control (Tabla 1) (Fig. 16 - 3b). No se afectó el intervalo QT en este grupo y tampoco cuando se confrontaron los efectos de DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM añadidos sucesivamente. Como dato de interés, resalta la mayor duración de QV ($14,500 \pm 2,986$ ms $p < 0,001$) y LC ($365 \pm 38,691$ ms, $p < 0,001$), parámetros no alterados con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM actuando sucesivamente (Fig., 16 - 2b).

Estos últimos datos dejan constancia de la bradicardia significativa y el retraso de la conducción a nivel de la unión Purkinje - miocardio "de trabajo", fenómenos constantes y también significativos con H_2O_2 2,9 mM y 5,9 mM perfundidos aisladamente (Fig. 9 a y b).

Finalmente, haciendo una aproximación entre las dos series de DMSO perfundido ininterrumpidamente junto con H_2O_2 12 mM, llama la atención el hecho de que el espacio QV no sufrió variación alguna a 10^{-3} M habiéndose alargado significativamente con 10^{-2} M ($p < 0,001$) como bien se recordará (Figs. 16 - 3 a y b). Por otra parte el intervalo AH se acortó significativamente como ya vimos, con 10^{-3} M, pero manteniéndose alargado con 10^{-2} M. Estos datos podrían tener cierta validez para explicar la mayor incidencia de FV con este último grupo, aunque mostrando

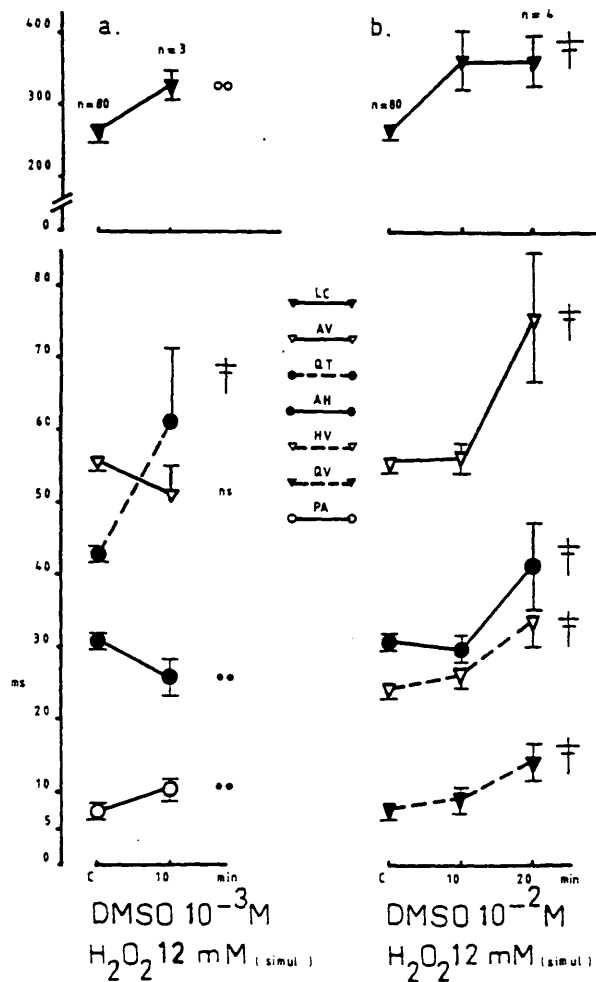
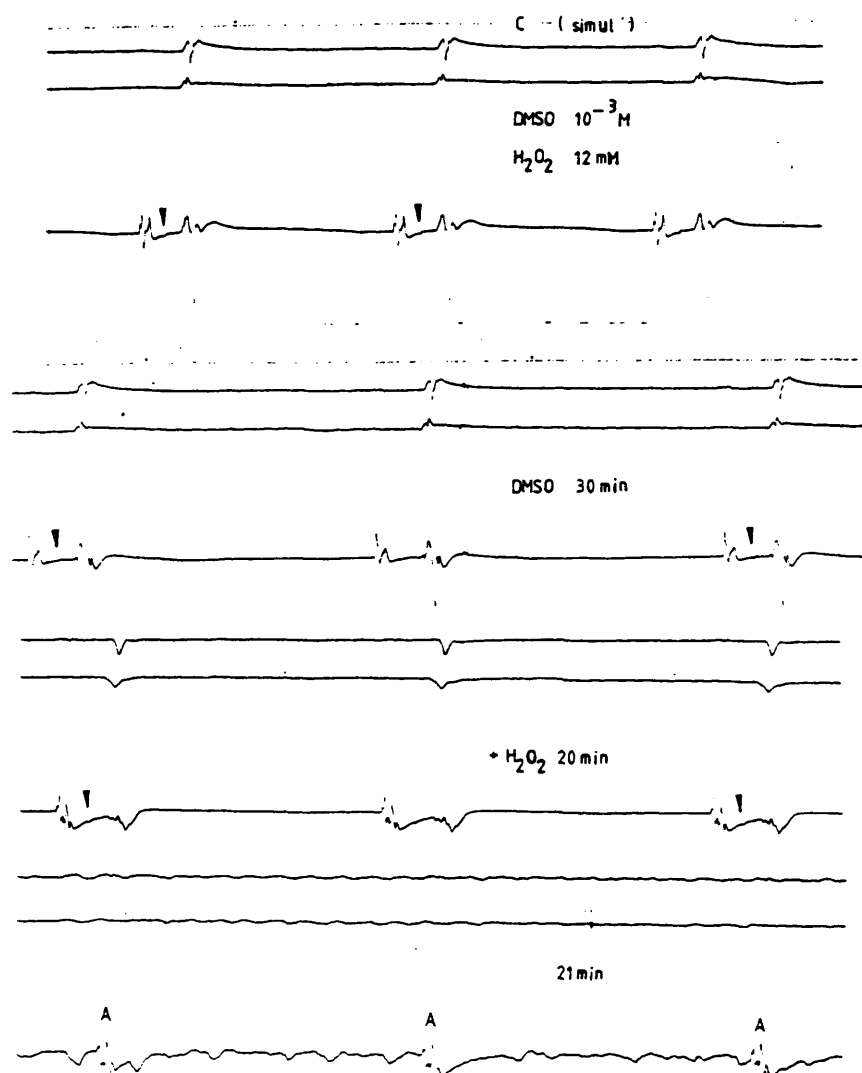
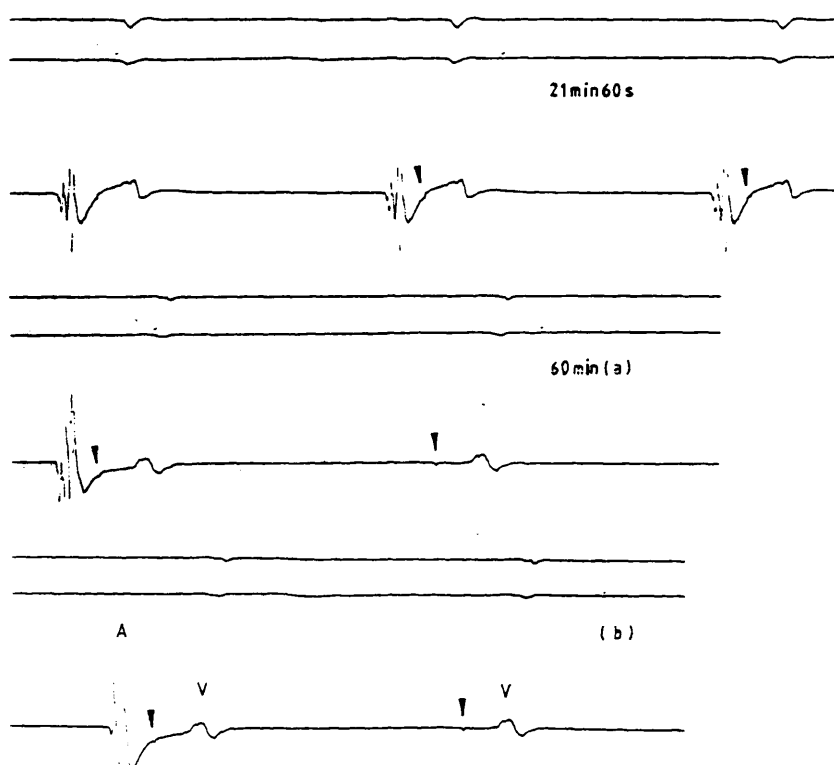
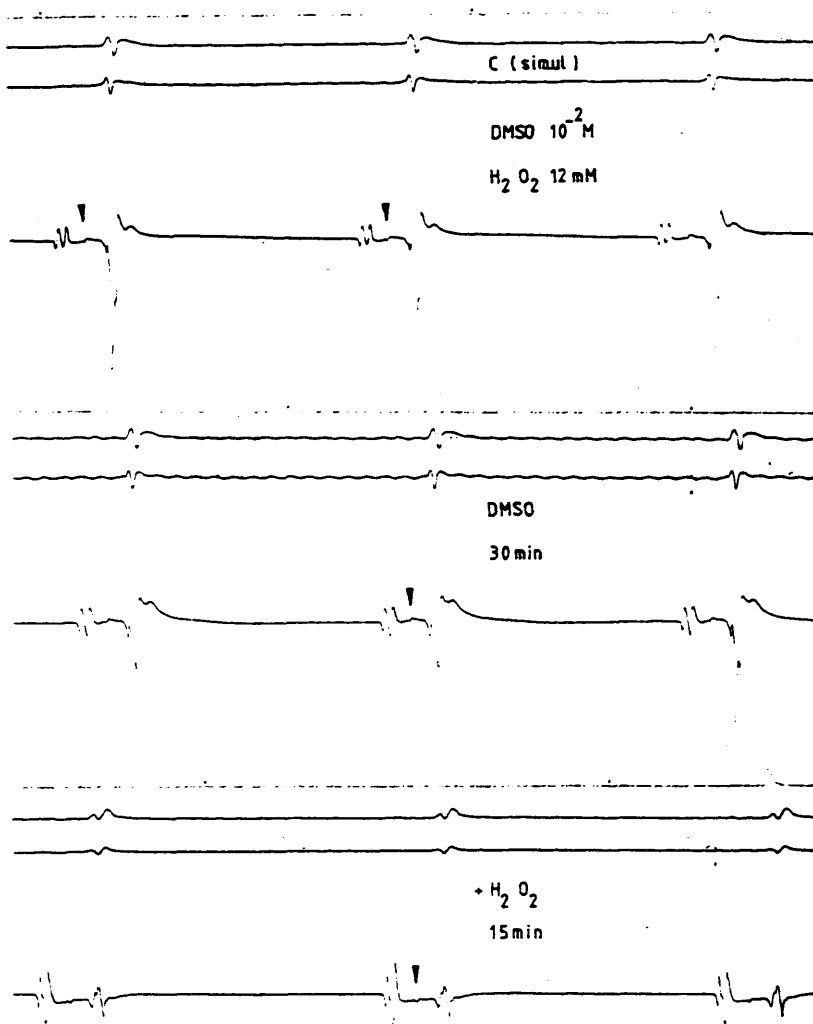


Fig.16-3. Efectos electrofisiológicos de DMSO y H_2O_2 perfundidos simultáneamente: plancha-a incluye los intervalos afectados con las moléculas respectivas de 10^{-3} M y 12 mM, mientras en plancha-b se muestran los resultados obtenidos con DMSO 10^{-2} M y H_2O_2 12 mM. En abscisas figura el tiempo en minutos (min) y en ordenadas los efectos en milisegundos (ms). (∞ $p < 0,050$; ** $p < 0,025$; † $p < 0,001$; ns = no significativo; simultáneamente "simul"). (Más información en el texto)





g.16-3. Las secuencias en la plancha-a' muestran como se desencadena FV a los 21 minutos de añadir H_2O_2 12 mM al DMSO 10^{-3} M, con recuperación de RS y CAV en 60 segundos (s). A pesar de la inversión del QRS, y posterior desaparición casi total de la actividad eléctrica periférica, la preparación siguió con RS hasta los 60 minutos de observación; iniciándose entonces BSA presentando conducción 2:1 (trazado continuo a los 60 minutos a y b). Símbolos con igual significado que en Figs. anteriores.



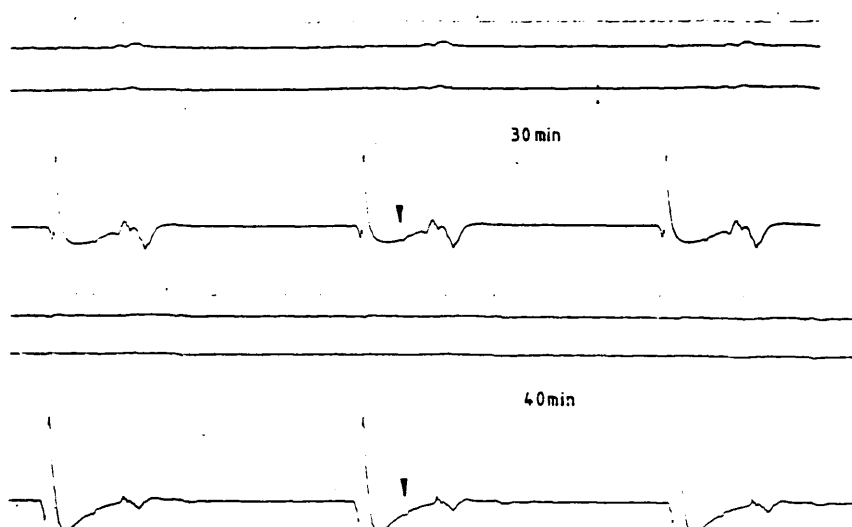


Fig.16-3. La plancha-b' demuestra la protección prestada por DMSO 10^{-2} M - perfundido simultáneamente con H_2O_2 12 mM más allá de los treinta minutos, no habiéndose desencadenado fv y/o FV. Hubo una salva de TV a los 18 minutos, no registrado por su brevedad. Se observa alargamiento progresivo del intervalo AH desde los 15 minutos de haber añadido H_2O_2 , y también reducción simultánea y progresiva del voltaje de QRS y ventriculograma, con desnivelamiento del "segmento" AV. Nótese la interferencia eléctrica ambiental a los 30-minutos de perfusión con DMSO. (Símbolos con igual significado que Figs. anteriores)

también solo 50% de incidencia global de FV y 25% de irreversibilidad, lo que nos deja un 75% de corazones en RS (Fig. 8 d-2)(Fig. 16-3b').

Se nos ofrece nuevamente la probable relación (dato a analizar) del incremento de la duración de AH con el desencadenamiento de FV, o protección en el caso de su acortamiento significativo. La reversibilidad en el 100% de las preparaciones de la serie con DMSO 10^{-3} M más $H_2 O_2$ (12 mM), apunta hacia la protección prestada por el DMSO perfundido ininterrumpidamente (Fig. 8 - d 1).

PROTOCOLOS CON MANITOL Y $H_2 O_2$

El Manitol, reconocido barredor de radicales libres hidroxilo (OH^{\cdot}) (159) entró también a formar parte de 3 series totalizando un efectivo de 23 corazones.

Primera serie.-

1.- Perfundido el Manitol aisladamente durante 30 minutos, se observaron los siguientes efectos a nivel de los parámetros intracavitarios: a la molaridad de 5 mM (n=9) se alargaron significativamente los espacios AH y QT ($35,778 \pm 2,093$ ms y $67,333 \pm 3,859$ ms, $p < 0,001$) respectivamente, y AV ($60 \pm 1,599$ ms, $p < 0,055$) en el límite de la significación (Fig. 17 - 1a). Resalta el 100% de BAV de primer grado (Tabla 2).

En el ensayo con 50 mM (n=14): además de los intervalos AH, QT y AV también se alargó el ciclo ventricular significativamente.

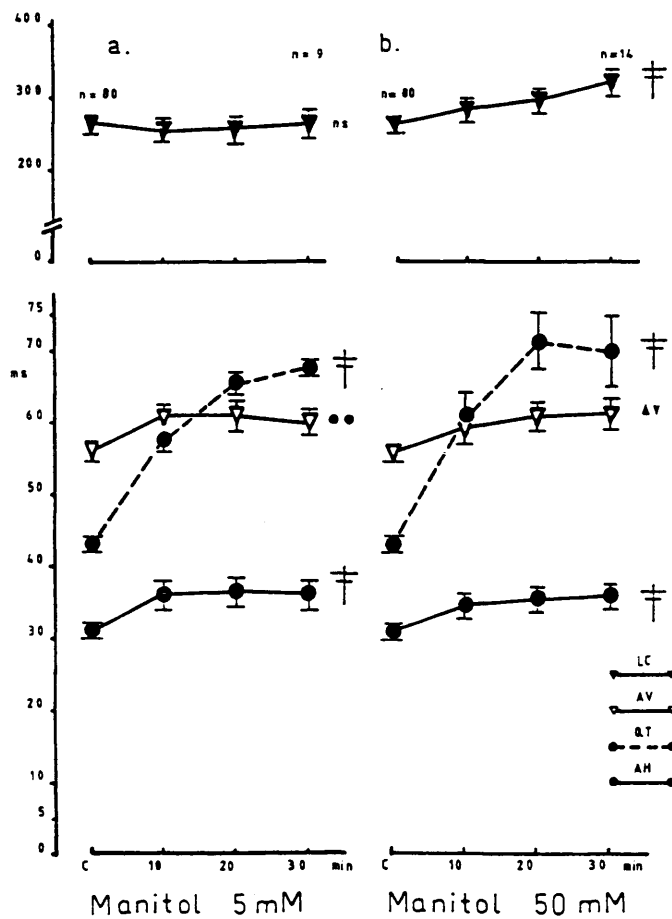


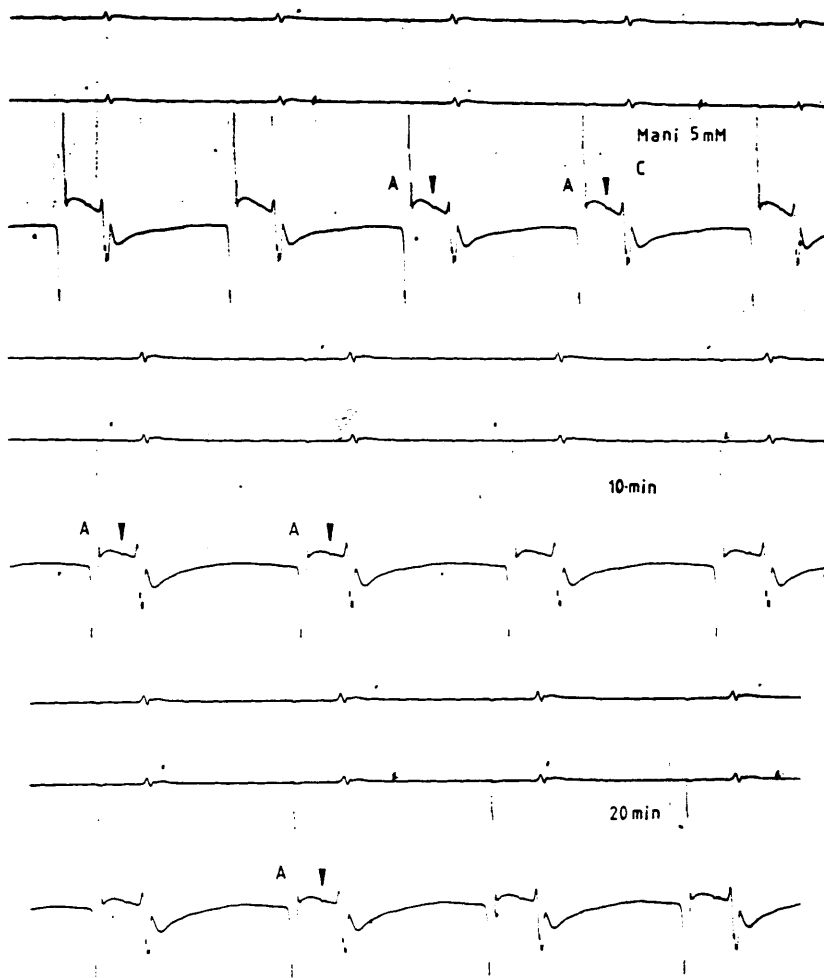
Fig.17-1. La plancha-a muestra los efectos electrofisiológicos de Manitol - 5 mM y en plancha-b figuran estos EEF con Manitol 50 mM. Las variaciones de los intervalos se expresan en milisegundos (ms, en ordenadas) y el tiempo en minutos (min, en abscisas). (Δ $p < 0,005$; triángulos, $p < 0,015$; \dagger $p < 0,001$; ns = no significativo). (Se amplia la información en el texto)

Los valores hallados fueron respectivamente: $35,500 \pm 1,695$ ms, $p < 0,001$; $70 \pm 5,095$ ms, $p < 0,001$; $61,300 \pm 2,044$ ms. $p < 0,015$; $322 \pm 13,565$ ms, $p < 0,001$ al concluir los 30 minutos de perfusión (Fig. 17-1b). También hubo un 78,57% de BAV de primer grado.

El Manitol 5 mM dió lugar a un 55,55% (n=9) de arritmias (Fig. 15) incluyendo EV aislados y dobletes, TV, bigeminismo ventricular. (Fig. 17-1a'). Algo similar ocurrió cuando se incrementó la molaridad a 50 mM (Fig. 17-1b'). mostrando una incidencia del 50% (n=14) (Fig. 15). Subrayemos que no ocurrió ningún caso de flutter y/o FV. El promedio de aparición de los disturbios del ritmo fue de $18 \pm 3,741$ min y $17 \pm 3,684$ min, respectivamente acercándose a los promedios de H_2O_2 (5,9 mM) perfundido aisladamente (Tabla 3); amén de los trastornos de la conducción.

Recuerdese que con DMSO perfundido aisladamente no sucedió ninguna disritmia. Estas concentraciones de Manitol se escogieron siguiendo resultados concretos obtenidos en la literatura y trabajando con el mismo modelo de corazón aislado de rata. (75).

Un hecho que se debe recalcar también es el alargamiento significativo del intervalo AH a ambas concentraciones de Manitol perfundido aisladamente, de forma parecida a lo sucedido con H_2O aislado 2,9 mM, 5,9 mM y 29 mM. Queda también evidente el poder arritmogénico del Manitol, razón de peso para limitar las dosis usadas. Los dos protocolos de perfusión con H_2O_2 (independientemente de la concentración) se fundamentan en la comprobación del lugar de acción del Manitol (intra o extracelular)



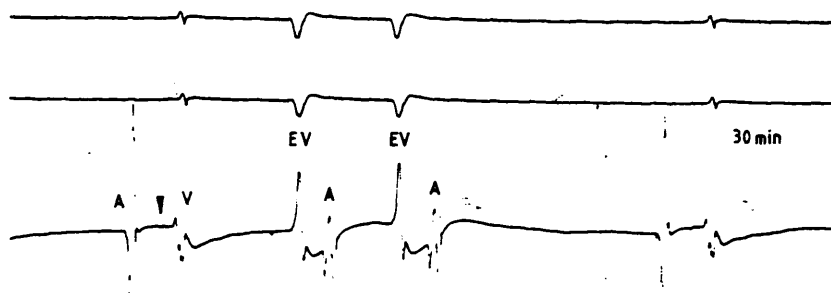


Fig.17-1. La plancha-a'pone de relieve el efecto arritmogénico de Manitol 5 mM perfundido aisladamente. Desde los 10 minutos se observa alargamiento del intervalo AH que se incrementó en fases posteriores. A los 30 minutos de perfusión ya se inician arritmias ventriculares con aparición de dobletes. (Más información en el texto)

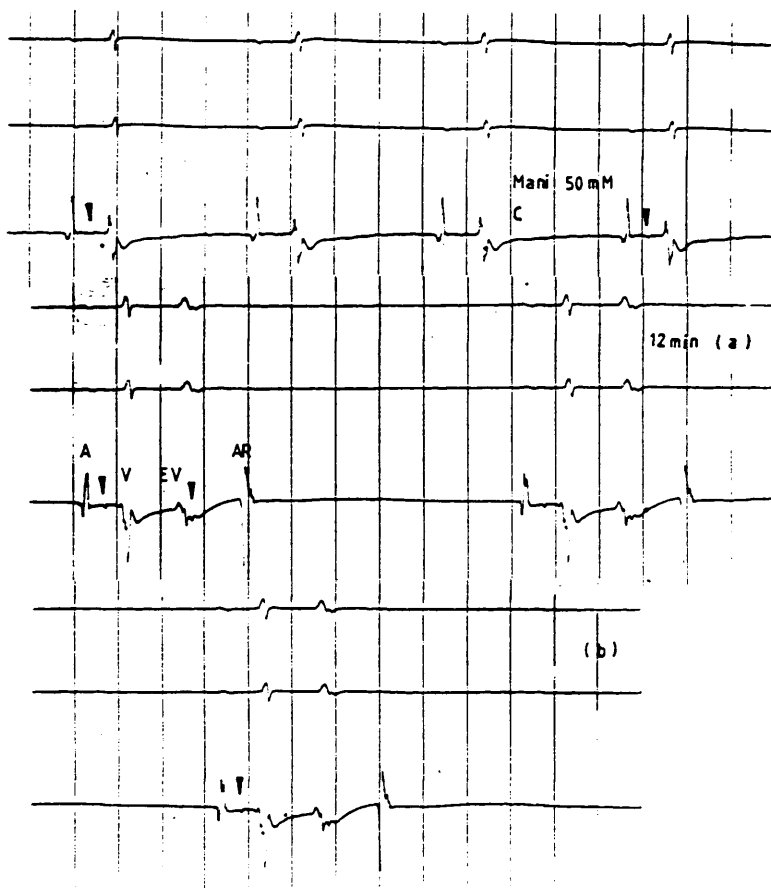


Fig.17-1. La plancha-b' recalca aún más el efecto arritmogénico de Manitol perfundido aisladamente, en este caso a la concentración de 50 mM. A los 12 minutos (trazo continuo a y b) se establece ritmo bigemínado de origen ventricular, conduciendo los latidos ventriculares ectópicos en sentido retrógrado. (Símbolos, igual significado que en Fig.6). (Ver texto para más información)

como barredor del radical OH^\bullet (78).

Segunda serie.-

Contrastando los efectos del Manitol con H_2O_2 se siguieron los protocolos ya expuestos para el DMSO.

1.- Primero los dos fármacos se añadieron sucesivamente al sistema de perfusión, empezando con Manitol (5mM) y H_2O_2 (12 mM) (n=4). Los parámetros del hisiograma se modificaron como sigue, pero analizando solamente 10 minutos de gráfica, puesto que las preparaciones fibrilaron (Fig. 17-2a') en un promedio de $13,75 \pm 0,75$ min (el 100%) (n=4), no recuperándose ninguno; fenómeno equiparable al desencadenamiento de FV con H_2O_2 aislado 12 mM como bien se observa en las Figs. (8 e-1) y (8 a).

Aumentó la duración de LC ($322,33 \pm 43,880$ ms, (ns); AV ($66 \pm 4,082$ ms, $p < 0,025$; QT ($79,500 \pm 7,320$ ms, $p < 0,001$; y AH ($40 \pm 3,651$ ms, $p < 0,015$) (Fig. 17-2a). Todos los valores se comparan al control (Tabla 1).

2.- Siguiendo la misma pauta, otros 4 corazones se usaron, aumentando la concentración de Manitol a 50 mM pero manteniendo el H_2O_2 igual. De manera equiparable, se alargaron significativamente los intervalos AH ($42,667 \pm 4,807$ ms, $p < 0,001$; AV ($66,667 \pm 4,807$ ms, $p < 0,001$). Los intervalos QT y LC iniciaron un brusco ascenso a los 10 minutos para luego acortarse: $52 \pm 12,859$ ms y $266 \pm 64,010$ ms respectivamente, (ns) en ninguno. (Fig. 17 -2b). Es de interés anotar que se atrasó

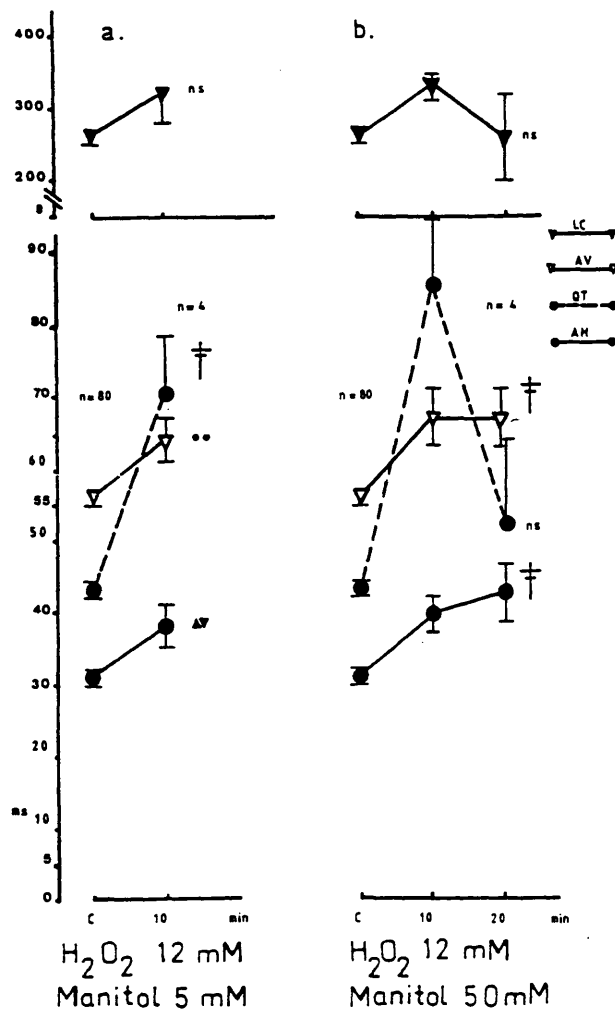
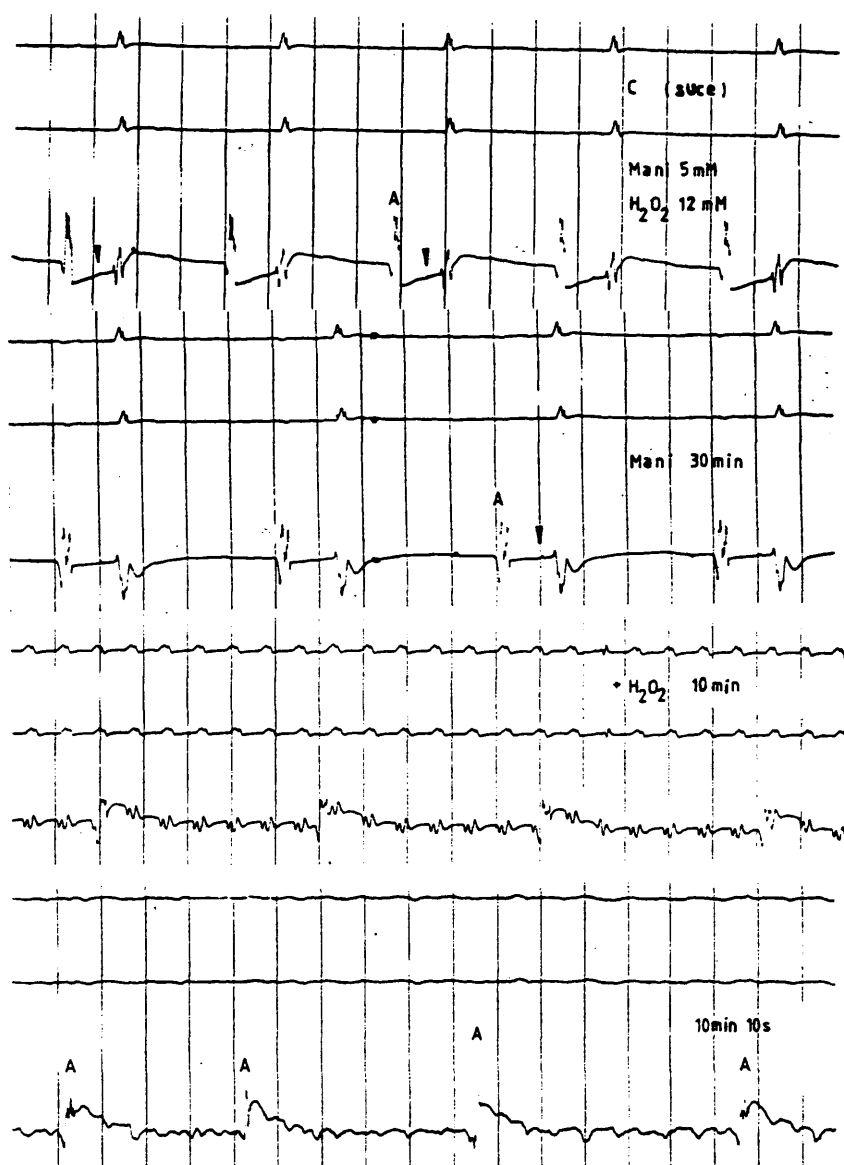


Fig.17-2. Efectos electrofisiológicos de Manitol 5 mM y H₂O₂ 12 mM perfundidos sucesivamente (succe) (plancha-a). Se obtuvieron solo diez minutos de gráfica debido a la presentación precoz de FV. Con Manitol 50 mM y H₂O₂ 12 mM (plancha-b), las gráficas abarcan 20 minutos de perfusión por las mismas razones antedichas. Se expresa el tiempo en minutos (min) en abscisas y las modificaciones de los diferentes intervalos en milisegundos (ms, ordenadas). (** p < 0,025; triángulos, p < 0,015; † p < 0,001; ns = no significativo). (Más información en el texto)



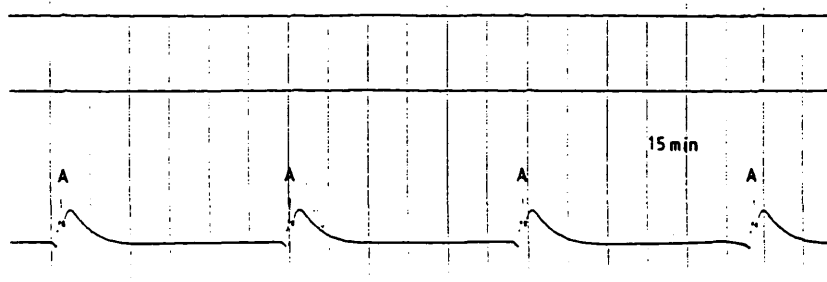


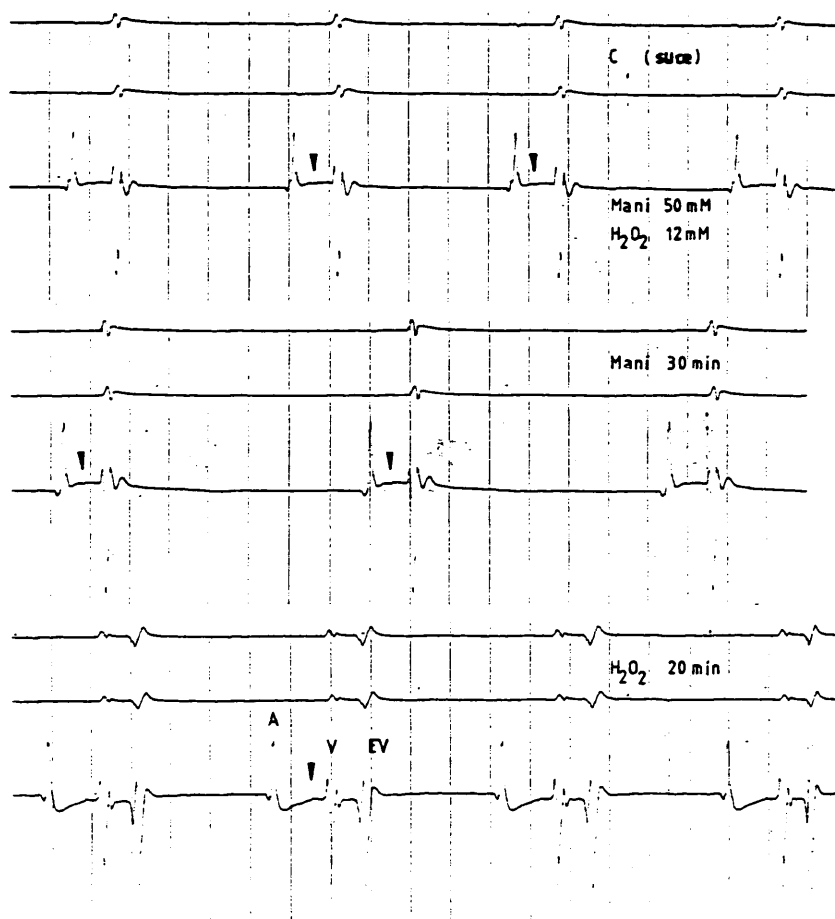
Fig.17-2. Las secuencias de la plancha-a' ponen en evidencia la ausencia de protección ofrecida por Manitol 5 mM frente a H_2O_2 12 mM. - perfundidos sucesivamente (suces). Se presentó TV a los 10 minutos de haber añadido H_2O_2 degenerando a FV en escasamente 10 segundos con DIV; apreciándose ya la corriente de lesión (Ta en "tienda de campaña") que persiste cuando se establece RA a los 15 minutos observando solo ondas P en el ECG periférico. (Símbolos con igual significado que Figs. anteriores). (Más información en el texto)

significativamente la aparición de las arritmias en este grupo, desencadenándose FV (Fig. 17-2b') en un promedio de $21 \pm 2,159$ min con $p < 0,025$, comparado con el grupo anterior de Manitol 5 mM y con H_2O_2 aislado 12 mM (Tabla 3). Pero igualmente se afectó el 100% con la excepción de haberse recuperado un 25% (n=4) en un minuto (Tabla 3) (Fig. 8-e2). También es importante resaltar que esta preparación se mantuvo en RS menos de un minuto, pasando a RA y bloqueo nodal completo. Atendiendo a los criterios establecidos en material y métodos, el Manitol en este contexto no protege.

Tercera serie.-

En esta serie se estudió el comportamiento de ambas sustancias respetando las concentraciones últimas pero con el Manitol perfundido ininterrumpidamente.

A primera vista, llama la atención el acortamiento del tiempo hasta la presentación de FV (Fig. 17-3a'), afectando el 100% (n=4) de las preparaciones en un promedio de $10,75 \pm 1,101$ min., $p < 0,005$ (Tabla 3) significativamente más precoz que en la serie precedente a igualdad de concentración tanto de Manitol (50 mM) como de H_2O_2 (12 mM). Por otra parte las arritmias desencadenadas desde los primeros minutos no permitieron analizar los parámetros del hisiograma más allá de los cinco minutos (Fig. 17-3a). Aquí también se recuperó el 25% (n=4) en un plazo breve (1 minuto) (Tabla 3) (Fig. 8-f). Pero no se apreció diferencia respecto a la serie precedente de Manitol 50 mM y H_2O_2 12 mM



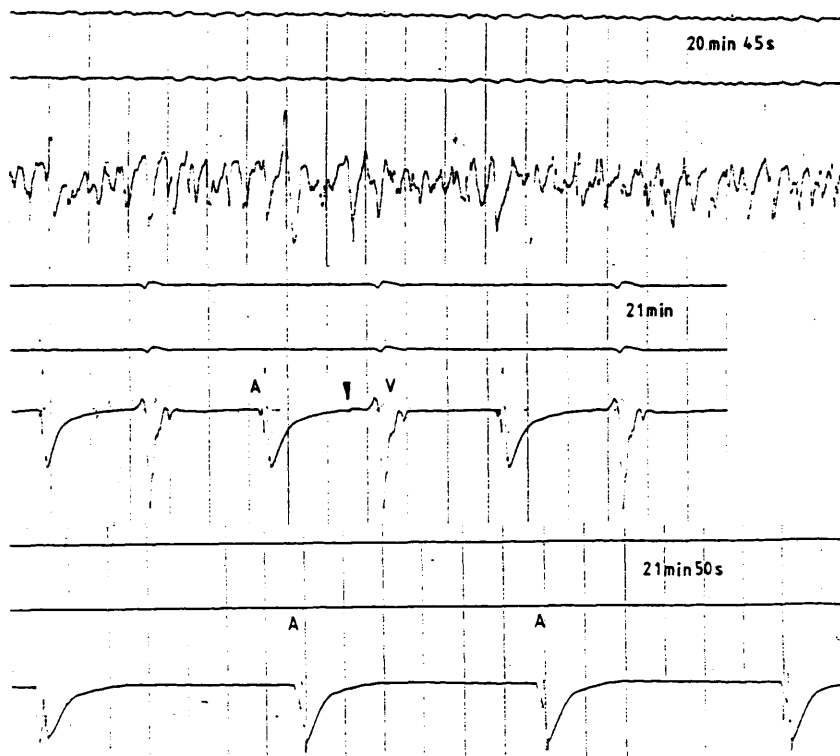


Fig.17-2. Las secuencias de la plancha-b' corroboran la falta de protección prestada por el Manitol, incluso a la molaridad de 50 mM frente a H_2O_2 12 mM perfundido sucesivamente (suces). En este caso, se observa bigeminismo de origen ventricular a los 20 minutos de haber añadido H_2O_2 al sistema de perfusión, degenerando a FV en 45 segundos con DIV. Se recupera el RS en 1 minuto con bloqueo suprahisiano de primer grado y corriente de lesión a nivel del aurículograma. Pero se establece RA terminal en escasamente 50 segundos, persistiendo la corriente de lesión; Ta en "tienda de campaña". (Símbolos con igual significado que en Figs. anteriores). (Para más amplia información, ver texto)

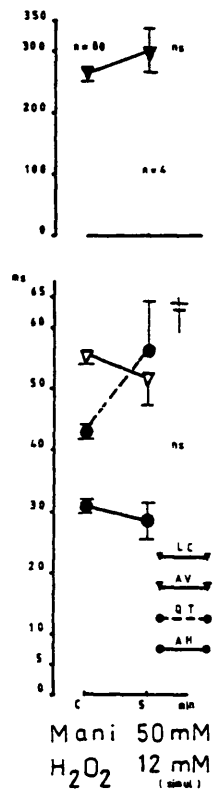
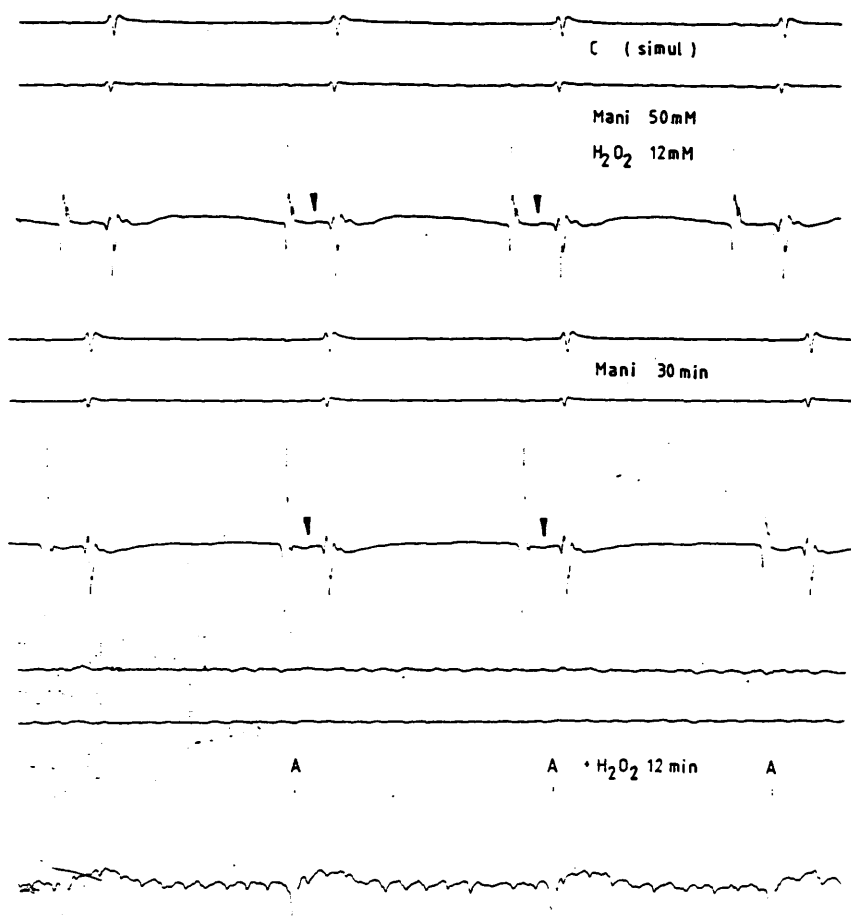


Fig.17-3. La plancha-a muestra los efectos electrofisiológicos de Manitol - 50 mM y H₂O₂ 12 mM perfundidos simultáneamente (simul). Se añade H₂O₂ al Manitol después de 30 minutos de perfusión con esta última sustancia aisladamente. Nótese que las gráficas abarcan - solo cinco minutos de perfusión, debido a la presentación precoz de FV. Figura el tiempo en minutos (min, abscisas) y las modificaciones de los intervalos en milisegundos (ms, ordenadas). (Símbolos, igual que en Figs. anteriores). (Se amplia la información en el texto)



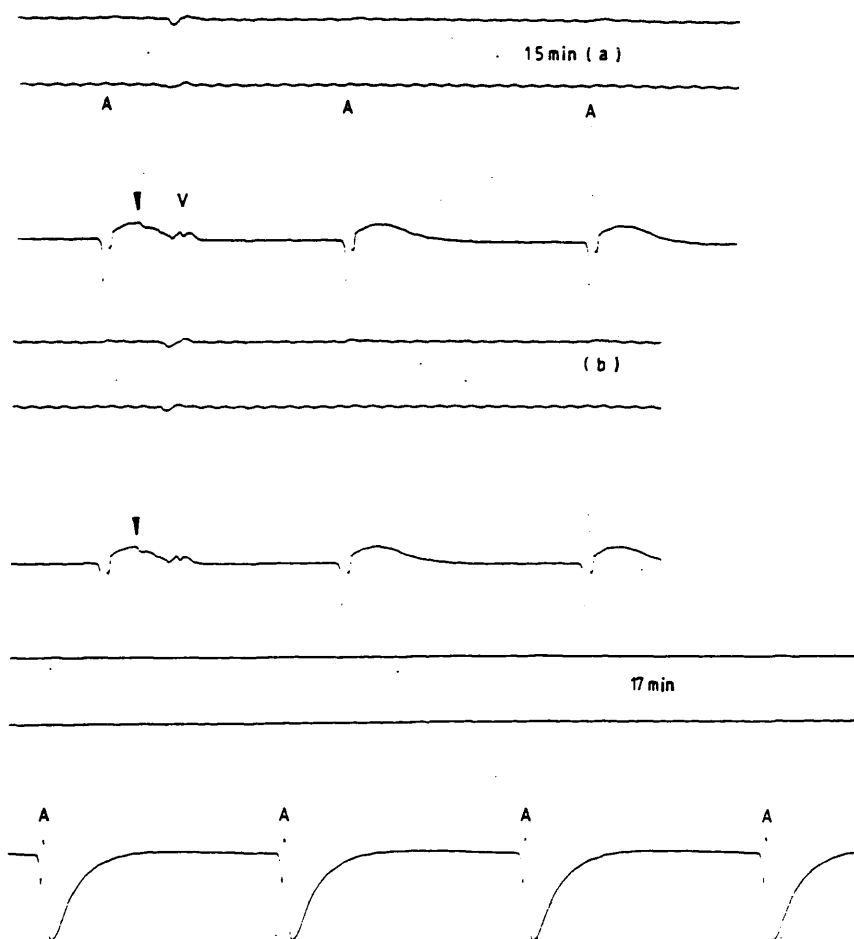


Fig.17-3. La plancha-a' muestra un ejemplo del comportamiento de Manitol - 50 mM y $H_2 O_2$ 12 mM perfundidos simultáneamente (simul) segun se vió en pié Fig.17-3. a. Aquí se desencadenó FV a los 12 minutos de haber añadido $H_2 O_2$ al Manitol. Se puede observar la ya descrita DIV. Hay intento de recuperación de RS a los 15 minutos, acompañado de bloqueo nodal 3:1 (trazado continuo a y b) pudiéndose observar tambien la corriente de lesión. Pero en 2 minutos se establece RA terminal, persistiendo la corriente de lesión - con Ta en "tienda de campaña" , y ninguna actividad eléctrica aparente a nivel periférico. (Ver texto para más información)

añadidos sucesivamente, puesto que se mantuvo el RS apenas dos minutos y además con bloqueo nodal 3:1 y 5:1 (Fig. 17-3a') hasta hacerse completo.

Sobresale el alargamiento significativo del espacio QT respecto al control (Tabla 1): ($54,750 \pm 9,357$ ms, $p < 0,001$ (Fig. 17-3a). Recuerdese que no mostró significación cuando se perfundió con Manitol 50 mM y H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente ($52 \pm 12,85$ ms, ns) (Fig. 17-2b). Pero se estableció la significación usando Manitol 5 mM con H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente ($p < 0,001$) (Fig. 17-2a).

Se puede subrayar la tendencia adicional a modificarse los siguientes intervalos; no significativo frente a los valores control: AH se acortó levemente ($28,250 \pm 3,376$ ms, ns), también AV ($52 \pm 4,24$ ms, ns). Por otra parte, hubo tendencia a la bradicardia (LC $305 \pm 35,114$ ms, ns), cuando se perfundió con Manitol ininterrumpidamente (fig. 17-3a).

Con los datos aportados hasta ahora, queda evidente la escasa o nula protección prestada por el Manitol (independientemente de las concentraciones usadas y del protocolo seguido) frente a las arritmias y FV desencadenadas por H_2O_2 (12 mM). Recordar al respecto que la incidencia de FV fue nula con DMSO $10^{-3}M$ (concentración inferior a las usadas con Manitol) confrontado con los efectos de H_2O_2 (12 mM) perfundido sucesivamente. (Fig. 8-c2) y (16-2b'). Además recuérdese el 100% ($n=9$, $p < 0,001$) y 78, 57% ($n=14$, $p < 0,005$) de bloqueo supraventricular de primer grado con Manitol 5 mM y 50 mM respectivamente, frente a DMSO perfundido aisladamente (Tabla. 2).

PROTOSCOLOS CON GLUCOSA Y H_2O_2

Fundamentándonos en la capacidad de la glucosa 20 mM para contrarrestar los efectos nocivos del 2,4 DNF y cianuro así como de la hipoxia sobre miocitos aislados del ventrículo de cobaya (160), se montaron 2 protocolos con la glucosa. En estas series conviene recalcar que las mismas preparaciones sirvieron para analizar los posibles efectos de esta sustancia aisladamente, añadiendo a posteriori H_2O_2 .

Primera serie.-

La glucosa aisladamente a la concentración de 20 mM no desencadenó ninguna arritmia durante los 30 minutos de perfusión previstos en el protocolo (Figs. 15 y 18-la') y ningún disturbio de la conducción ($p < 0,005$, $n=4$) respecto a Manitol 50 mM aisladamente (Tabla. 2).

Se pudo observar acortamiento del intervalo AH ($29,50 \pm 1,500$ ms) (ns), respecto al control (Tabla 1). Se modificaron los intervalos QV, HV, AV (ninguno presentó significación estadística) y la LC, manifestándose solamente la bradicardia como significativa. Los valores respectivos a los 30 minutos fueron: QV $10,500 \pm 0,957$ ms (ns); HV $27,500 \pm 1,323$ ms (ns); AV $57 \pm 1,187$ ms (ns) y LC $347,250 \pm 23,648$ ms ($p < 0,015$). (Fig. 18-la).

Segunda serie.-

Al añadir H_2O_2 (12 mM) a la glucosa, es de interés señalar que se mantuvo la reducción del AH aunque tampoco con significación estadística ($27,500 \pm 1,701$ ms) (ns) respecto al control. Aquí también

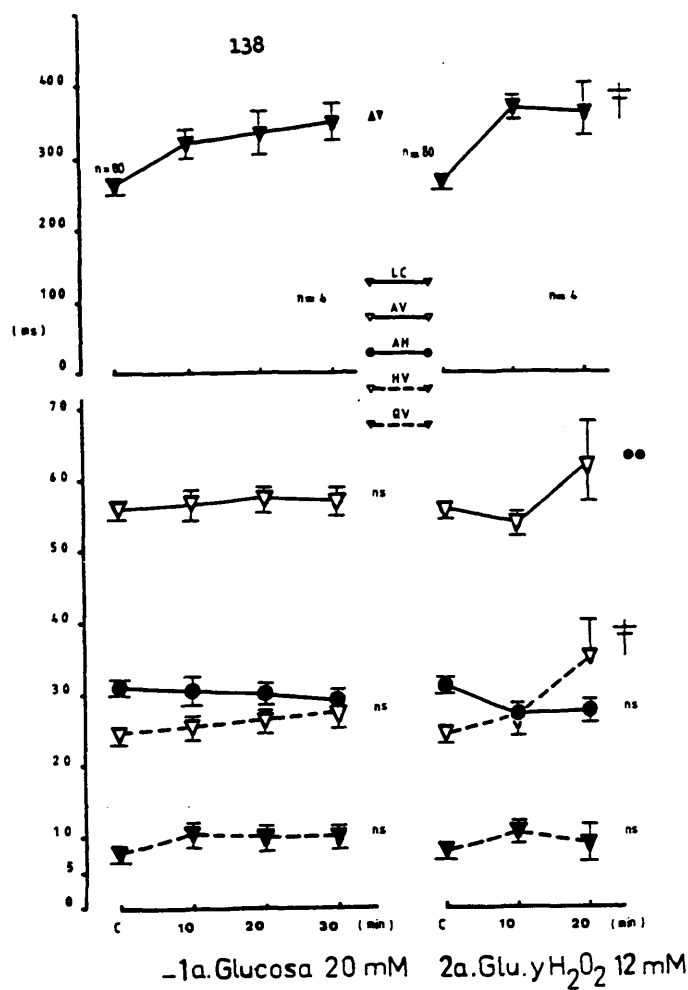


Fig. 18-1. Efectos electrofisiológicos de Glucosa 20 mM perfundida aisladamente durante 30 minutos. En abscisas figura el tiempo en minutos (min) y en ordenadas, las variaciones de los intervalos en milisegundos (ms). (plancha-a). (triángulos, $p < 0,015$; ns = no significativo). (Ver texto para más información)

Fig. 18-2. Gráfica representando los efectos electrofisiológicos de Glucosa 20 mM y H_2O_2 12 mM perfundidos simultáneamente. H_2O_2 se añade a la Glucosa después de 30 minutos de perfusión con esta última sustancia aisladamente. La plancha-2a (márgen derecho) muestra el tiempo en minutos (abscisas) y las variaciones de los diferentes intervalos en milisegundos (ms, ordenadas). Nótese que se representan solo 20 minutos de perfusión, a pesar de no haberse desencadenado fr y/o FV, debido al orden de aparición de --salvas esporádicas de TV. (es $p = 1s$, límite de la significación; $\frac{1}{2} p < 0,001$; ns = no significativo). (Más información en el texto)

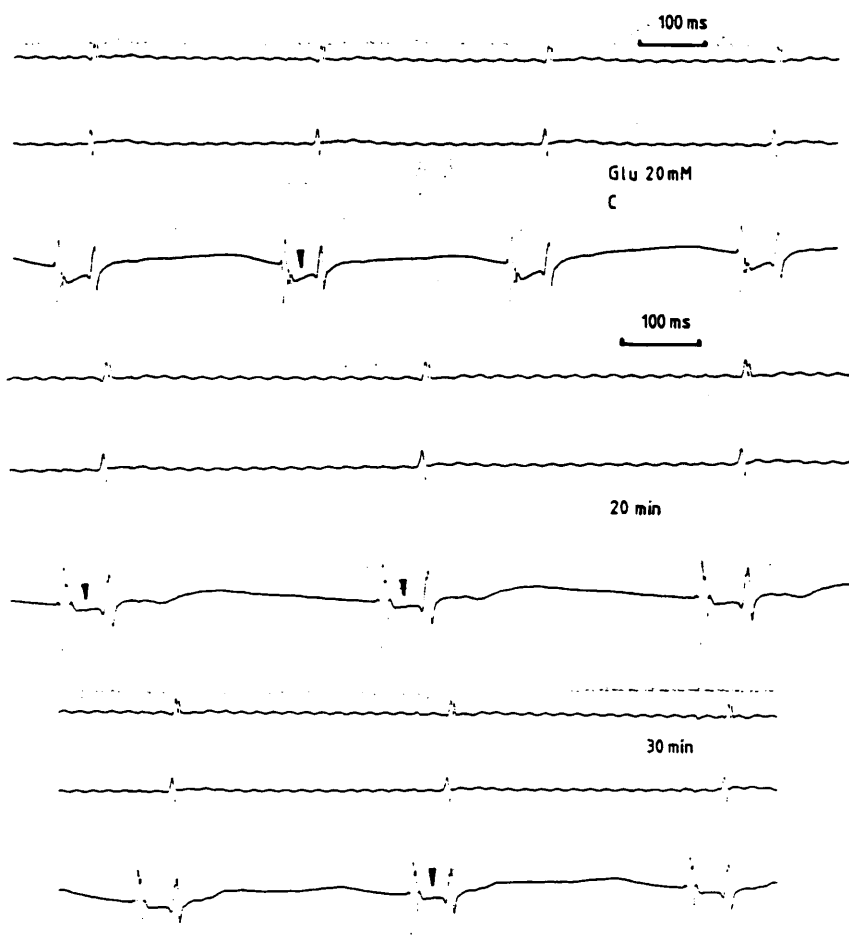
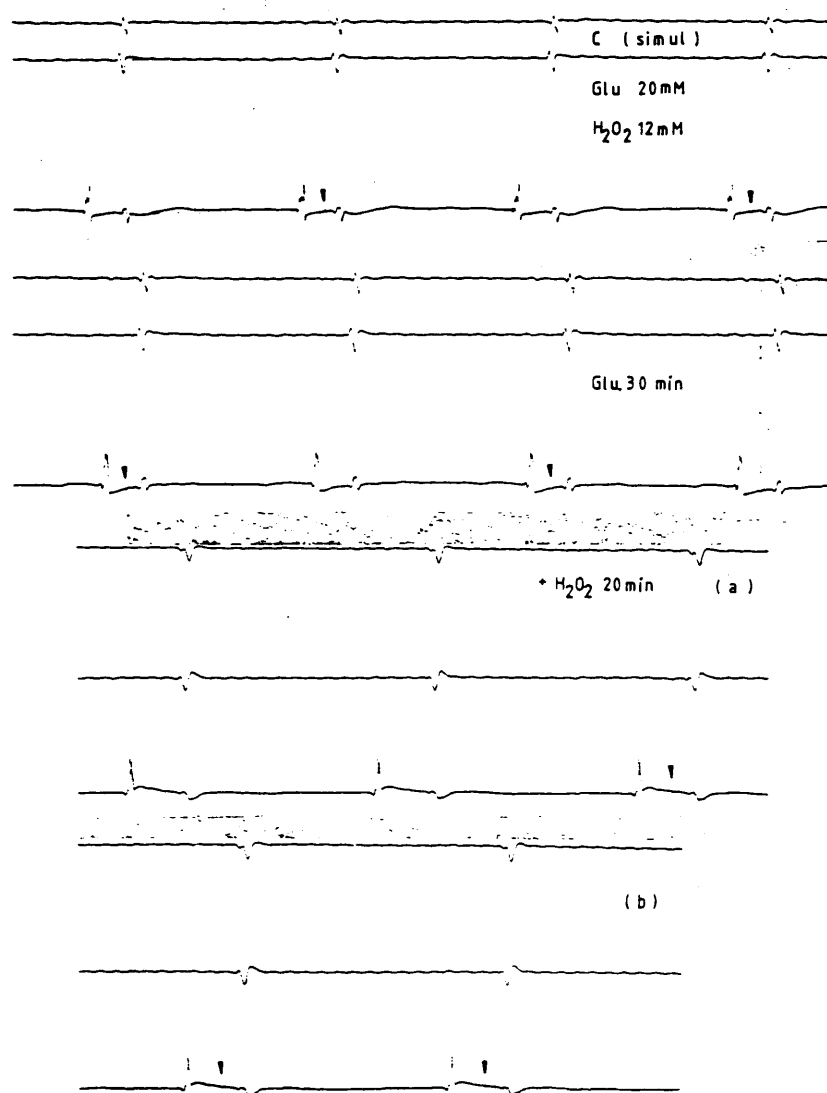


Fig.18-1. La plancha-a' demuestra la ausencia de arritmias con Glucosa 20 mM perfundida aisladamente durante 30 minutos. (Nótese la fina ondulación de la línea isoeletrica en el ECG debido a interferencia eléctrica ambiental). Símbolos con igual significado que en Figs. anteriores.(Más información en el texto)



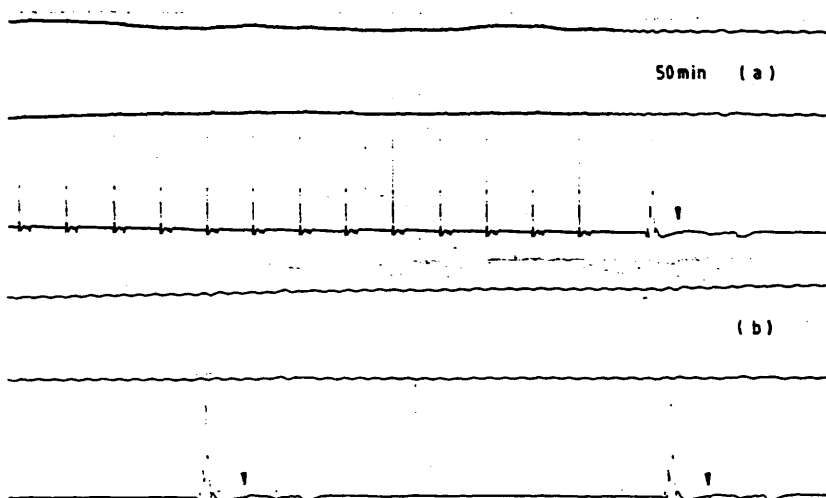


Fig.18-2. Las secuencias de la plancha-2a'ponen de relieve el efecto protector de Glucosa 20 mM perfundida simultáneamente con H_2O_2 12 mM durante 60 minutos, no habiéndose desencadenado fv y/o FV . En el ejemplo presentado no se documentó ningún trastorno del ritmo. Nótese las ondulaciones de la línea isoelectrica en ambos canales del ECG debido a interferencia eléctrica ambiental. A los 50 minutos de perfusión (trazado continuo a y b), la secuencia "a" registrada a 25 mm/s permite comprobar que se mantiene actividad eléctrica sincronizada a nivel periférico. Se puede apreciar también el escaso voltaje de los electrogramas intracavitarios desde el trazado control. (Símbolos con igual significado que Figs. anteriores). (Ver texto para más información)

se alargaron los espacios AV y LC además de HV; pero QV después de aumentar inicialmente, volvió a reducirse ($9,333 \pm 2,667$ ms) (ns). Se hallaron las medidas siguientes: AV $62,500 \pm 6,752$ ms, (ns); LC $365 \pm 30,871$ ms, $p < 0,001$; HV $35 \pm 5,916$ ms, $p < 0,001$. (Fig. 18-2a).

Hay que puntualizar que ninguno de los corazones fibriló ($n=4$), acercándonos así al grupo de DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente. Por otra parte el orden de presentación de los efectos observados tales como: taquiarritmias ventriculares (75%) ($n=4$) (Tabla 2), los cambios morfológicos de los electrogramas, así como la reducción del voltaje del ventriculograma respecto al control no permitieron analizar más allá de 20 minutos de grafica (Fig., 18-2a). Pero se pudo registrar RS pasados los 50 minutos de perfusión con glucosa 20 mM/ H_2O_2 12 mM conjuntamente (Fig. 18-2a').

ANÁLISIS DE LAS ARRITMIAS DESENCADENADAS

(incidencia general y por series específicas de experimentos)

Durante los estudios llevados a cabo, se presentó prácticamente toda la gama de disritmias conocidas en clínica humana, en proporciones variables.

Arritmias con H_2O_2 perfundido aisladamente

Considerando H_2O_2 perfundido aisladamente, se contabilizan 21 corazones. Analizando las diferentes arritmias desencadenadas, se observó una respuesta generalizada hacia la bradicardia, estimada indirectamente a partir de la longitud del ciclo cardíaco como ya se puntualizó, (95,23%) (n=21). (Tabla 2). Con excepción de la serie a la concentración de 12 mM que presentó una incidencia del 83,33% (n=6), se alcanzó el 100% a las demás concentraciones: 29 mM (n=6); 5,9 mM (n=4); 2,9 mM (n=5). (Tabla 2). Recordemos que la LC se alargó significativamente a todas las concentraciones (Fig. 9 a,b,c,d). Se comparan las incidencias de arritmias en la población total y por cada molaridad individualmente.

Se registró un 4,76% (n=21), de bloqueo sinoauricular de segundo grado tipo Mobitz II, correspondiendo a la serie 29 mM y presentándose a los 7 minutos de perfusión. Se dió el fenómeno de arritmia sinusal y marcapaso errante en un 9,52% (n=21), en el grupo de 29 mM y en el de 12 mM. Apareció taquicardia sinusal en un 4,76% del efectivo (n=21). Corresponde a H_2O_2 29 mM. Se pudo registrar un episodio de taquicardia o flutter auricular (Fig. 19) con H_2O_2 5,9 mM, lo que no deja de ser una curiosidad en la rata cuya aurícula conserva su actividad eléctrica

144

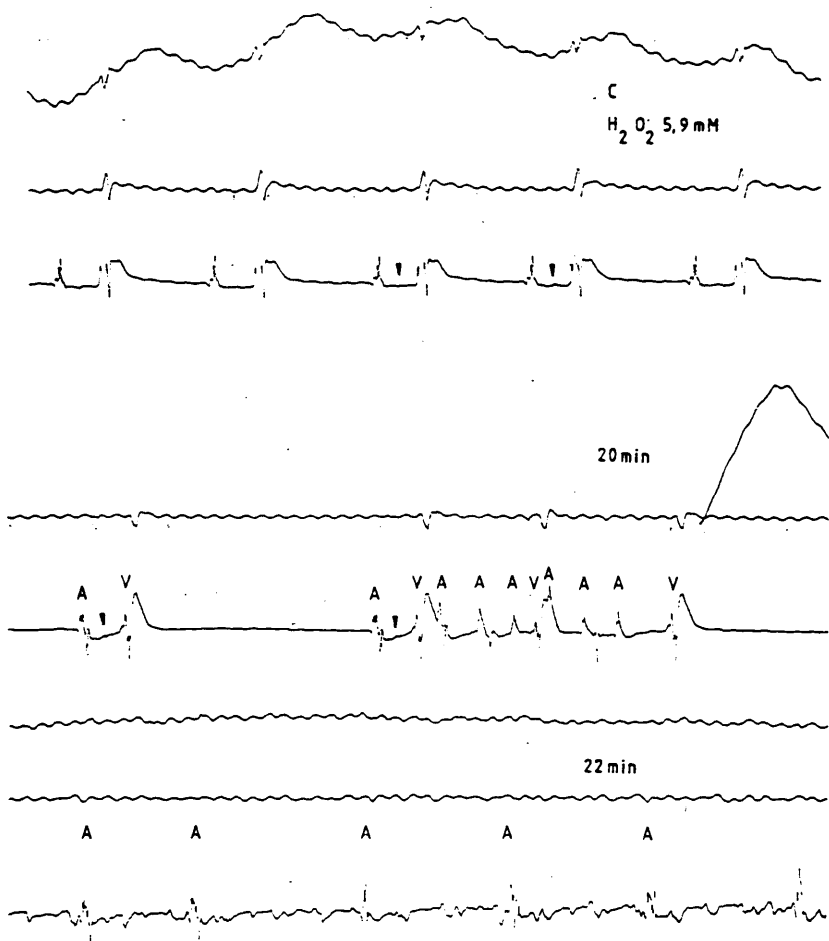


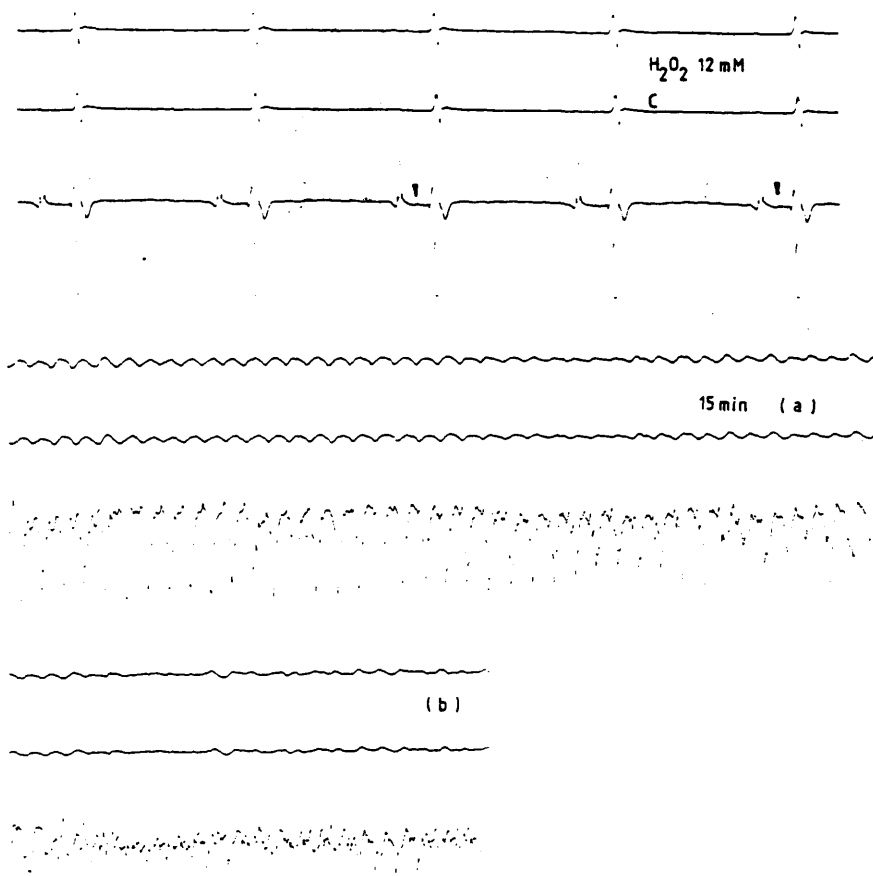
Fig.19. Esta secuencia electrocardiográfica quiere mostrar uno de los dos episodios de TA o fa observados a lo largo de todos los experimentos realizados. Este caso se dió a los 20 minutos de perfusión con $H_2 O_2$ 5,9 mM aisladamente. Esta preparación presentó FVi a los - 22 minutos. Subrayemos que este tipo de arritmias auriculares son infrecuentes en la rata. (Nótese la ondulación de la línea isoeleétrica por interferencias eléctricas ambientales). Símbolos con igual significado que Figs. anteriores. Más información en el texto.

homogénea inclusive durante los episodios de FV (Fig. 6). Además los corazones siguieron mostrando ritmo auricular (RA) aislado cuando ya no se evidencia ninguna actividad eléctrica ventricular aparente. Se dió otro caso de flutter auricular, confrontando los efectos de $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M}$ con H_2O_2 (12 mM) como veremos más adelante.

Se documentó un 9,52% (n=21) de taquicardia de la unión (TU) pertenecientes a las series de 12 mM y 2,9 mM. No faltaron extrasístoles auriculares (EA) en la misma proporción y a las mismas concentraciones antedichas. Hubo en la serie de 12 mM un 16,66% (n=6) de escapes hisianos (eH) durante un episodio de bloqueo nodal 2:1.

Queda bien destacado el predominio de las arritmias supraventriculares y de la unión auriculoventricular a las molaridades superiores: H_2O_2 12 mM y 29 mM como se demuestra en la Tabla 2 en lo que atañe a BSA, AS, EA, TS y IU.

Ocurrió extrasistolia ventricular (EV) incluyendo bigeminismo, dobletes, en practicamente la totalidad del efectivo estudiado 90,48% (n=21). (Tabla 2). Hay que destacar un ejemplo de bigeminismo ventricular y conducción retrógrada en una preparacion de H_2O_2 2,9 mM representativo de otros casos vistos a las demás molaridades. (Fig. 6). Comparativamente fue más bien baja la incidencia de taquicardia ventricular (TV) 33,33% (n=21) en sus modalidades sostenida, no sostenida, repetitiva. Se pudo documentar un ejemplo de "torsade de pointes" (TP) (Fig. 20) con - peróxido de hidrógeno 12 mM y otro de ritmo idioventricular acelerado



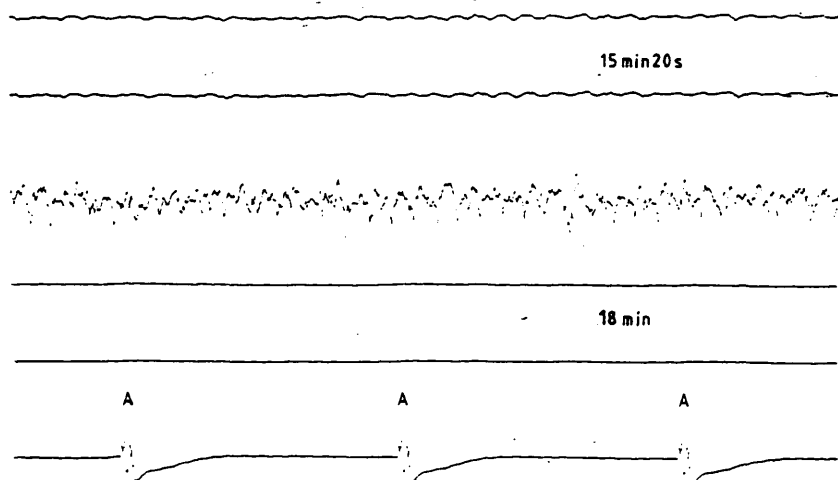


Fig.20. Esta plancha muestra el desencadenamiento de TV tipo "torsade de pointes" similar al fenómeno descrito en humanos. La arritmia se presentó a los 15 minutos de perfusión con H_2O_2 12 mM aislada - mente (trazado continuo a y b). Se inició FVi a los 15 minutos y 20 segundos, pasando a RA a los 18 minutos. (Símbolos con igual significado que Figs. anteriores). Se amplia la información en el texto.

(RIVA) manifestando trastornos del automatismo, con 2,9 mM (Fig. 21).

Cuando pasamos a considerar cada concentración de H_2O_2 individualmente, se observa cierta tendencia a una mayor incidencia de TV con los experimentos de más larga duración y molaridades más bajas. En efecto con 29 mM se suma un 66,66% (n=6) con EV y 16,66% (n=6) con TV. Ocurrió algo similar con 12 mM: EV 83,33% (n=4) y TV 33,33% (n=6). Pasamos a anotar 75% de incidencia de EV (n=4) y 50% de TV (n=4) con H_2O_2 5,9 mM, diferencia que queda más manifiesta con 2,9 mM (n=5): 40% de TV (n=5) y 100% de EV (n=5) (Tabla 2). Se dió también mayor tendencia a presentarse arritmias supraventriculares (EA, AS, TS, BSA) a las molaridades superiores (ns).

El tiempo medio de aparición de arritmias pareció también depender de la concentración de H_2O_2 . Así pues, se notó actividad ectópica ventricular alrededor de los $7,33 \pm 0,871$ min con 29 mM; $7,66 \pm 0,838$ min con 12 mM, llegando hasta $22,75 \pm 3,434$ min y $40 \pm 5,830$ min para las molaridades de 5,9 mM y 2,9 mM respectivamente, presentando significación estadística: $p < 0,012$ y $p < 0,001$ en el mismo orden (Tabla 3).

Destacó por otra parte un 52,38% (n=21) con bloqueo suprahisiano de 1º grado, repartidos sobre todo entre los ensayos de 2,9 mM, 80% (n=5). Se redujo el porcentaje al 50% con H_2O_2 5,9 (n=4) y 29 mM (n=6). Aun más baja proporción se dió con 12 mM, 33,33% (n=6). (Tabla 2).

Se presentó bloqueo AV de 2º grado en 52,38% (n=21) en sus tres

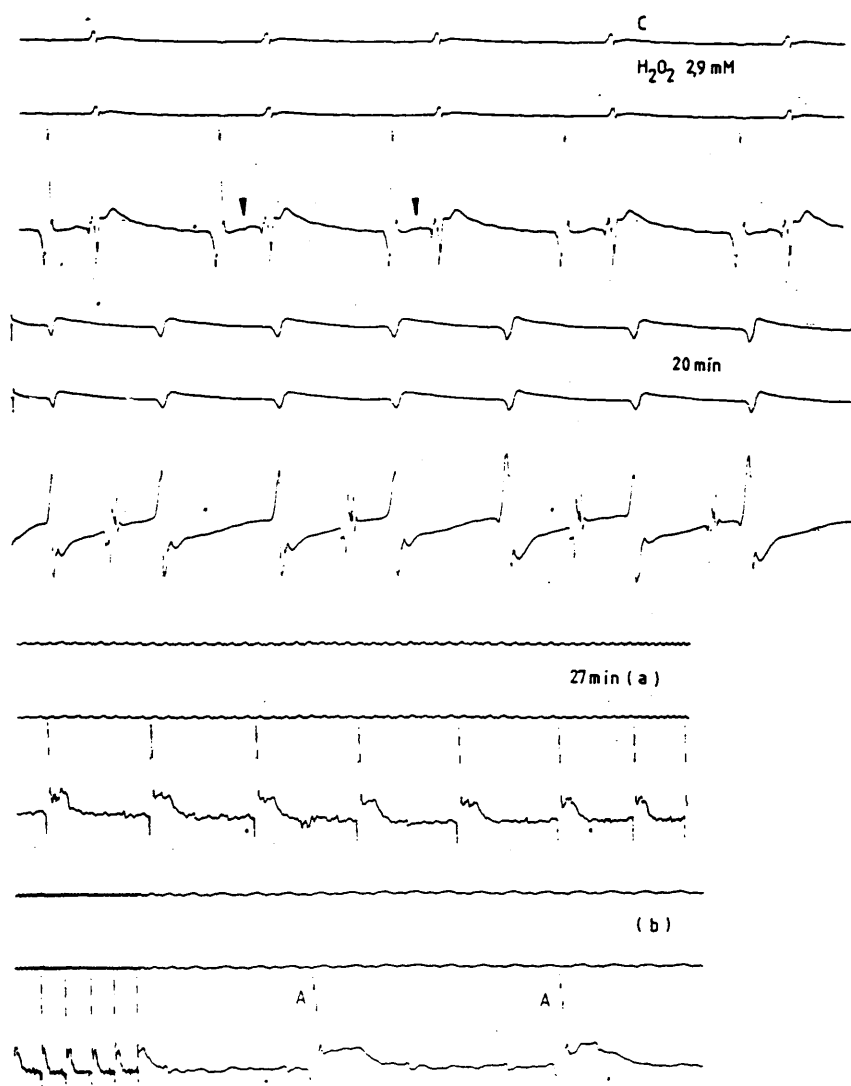


Fig.21. Ejemplo de RIVA a los 20 minutos de perfusión con H_2O_2 2,9 mM - aisladamente, desencadenándose FVi a los 27 minutos. Nótese la corriente de lesión (Ta en "tienda de campaña") en la tira continua a y b. (Registro a 100 mm/s en la secuencia a y 25 mm/s al inicio de la secuencia b. (Símbolos, igual significado que Figs. anteriores). Ver texto para más información.

modalidades: Wenckebach, Mobitz II y 2:1, en las proporciones de 19,04% las dos primeras (n=21) y 14,28% la última (n=21). Se llegó a la situación de bloqueo AV completo con RA en el 100% de las pruebas (n=21): siendo nodal en el 90,40% (n=21) e infrahisiano en el 9,52% (n=21). (Tabla 2). Los bloqueos de tipo infrahisiano pertenecen a los grupos de H_2O_2 29 mM y 5,9 mM. Señalamos de paso que se observó conducción retrógrada en un 23,80 % (n=21) repartándose como sigue: 33,33% (n=6) con H_2O_2 12 mM, 20% (n=5) en el grupo de 2,9 mM y 33,33% (n=6) con 29 mM. Se presentaron secuencias de Wenckebach retrógrado con las molaridades de 12 y 29 mM.

Se registró un 14,28% (n=21) de disociación AV (DAV), distribuyéndose entre las pruebas de 12 mM, 16,66% (n=6) y de 2,9 mM, 40% (n=5). (Fig. 6 d y f). Se pudo también documentar el fenómeno de disociación interventricular (DIV) por FV en el 80,95% de las preparaciones (n=21), registrando actividad eléctrica intracavitaria derecha, diferente morfológicamente y asincrónica con el ECG periférico. (Fig. 6- g). Se caracteriza la DIV por la presencia simultánea de ondas gruesas intracavitarias de FV intercalándose auriculogramas (rítmicos o arrítmicos) contrastando con la FV de onda fina en el ECG periférico, además hay asincronía manifiesta entre ambos fenómenos.

Se desencadenó FV en el 80,95% de casos (n=21) con la peculiaridad de que se cuenta un experimento sin la mencionada arritmia en cada grupo de H_2O_2 : 80% (n=5) con 2,9 mM; 75% (n=4) con 5,9 mM; 83,33% (n=6) con 12 mM y 83,33% (n=6) con 29 mM (Tabla 2). Dejamos claramente establecido que estos corazones que no presentaron FV acabaron todos en RA (estable-

ciéndose bruscamente) con bloqueo nodal completo, sin recuperación del RS y CAV durante 60 minutos de observación, intercalándose electrogramas auriculares rítmicos o arrítmicos, lo que acentúa aún más la DIV. Mientras a nivel del ECG periférico se vieron unas ondas finas asincrónicas con el registro central. Episodios de flutter ventricular (fv) precedieron a la FV en el 23,52% (n=17). Un dato a subrayar es que la única preparación que presentó asistolia de 3 minutos de duración a los 10 minutos de perfusión (4,76%) (n=21) corresponde al experimento de la serie H_2O_2 29 mM que no fibriló antes de pasar a RA terminal. (Fig.22). Ninguno de los experimentos a molaridades inferiores terminó en asistolia.

Consideramos aparte los cambios morfológicos del ECG e hisiograma, por presentar unas características probablemente relacionadas con el mecanismo de las arritmias desencadenadas.

Se documentó de forma mantenida la onda de repolarización auricular (Ia) con desnivelamiento en tienda de campaña sugerente de corriente de lesión a este nivel en 76,19% (n=21), variando del 60% al 100% según las concentraciones (Tabla 2). Curiosamente, los mayores porcentajes se distribuyeron alrededor de las soluciones de H_2O_2 de mayor molaridad (Figs. 6-h, 20 y 22). Los cambios de la onda T de repolarización ventricular, englobando los desnivelamientos positivos y negativos, afectaron al 80,95% de los experimentos (n=21). El complejo QRS mostró ensanchamiento y disminución del voltaje variando del 50% al 90% en un 76,19% (n=21). Los electrogramas intracavitarios auricular y ventricular sufrieron distorsiones similares en 62% (n=21) y 66,66% (n=21), respectivamente.

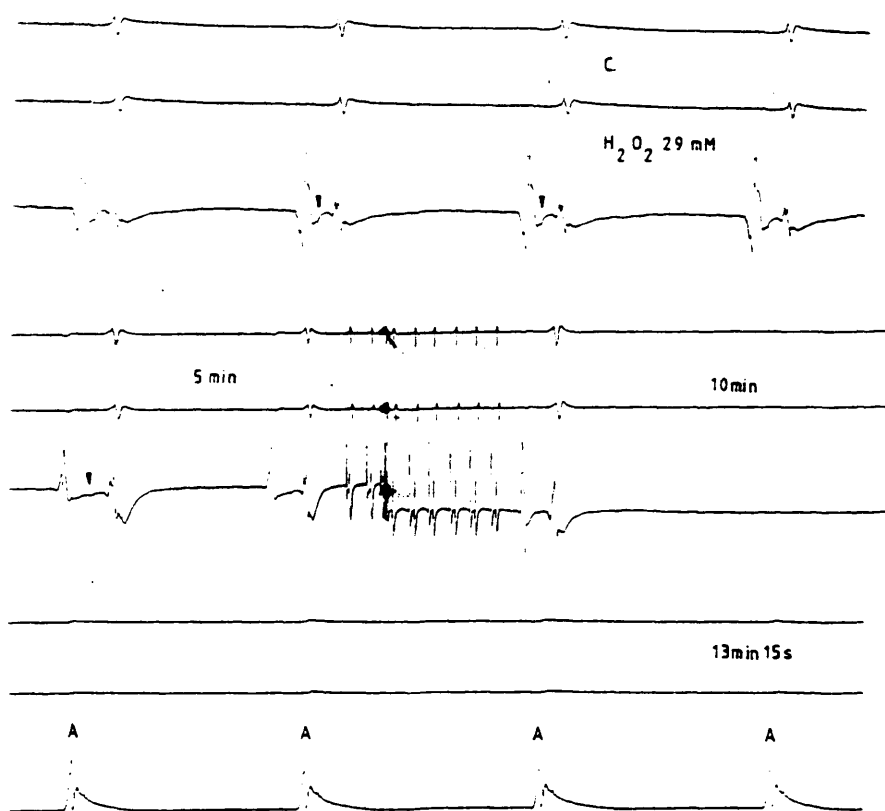
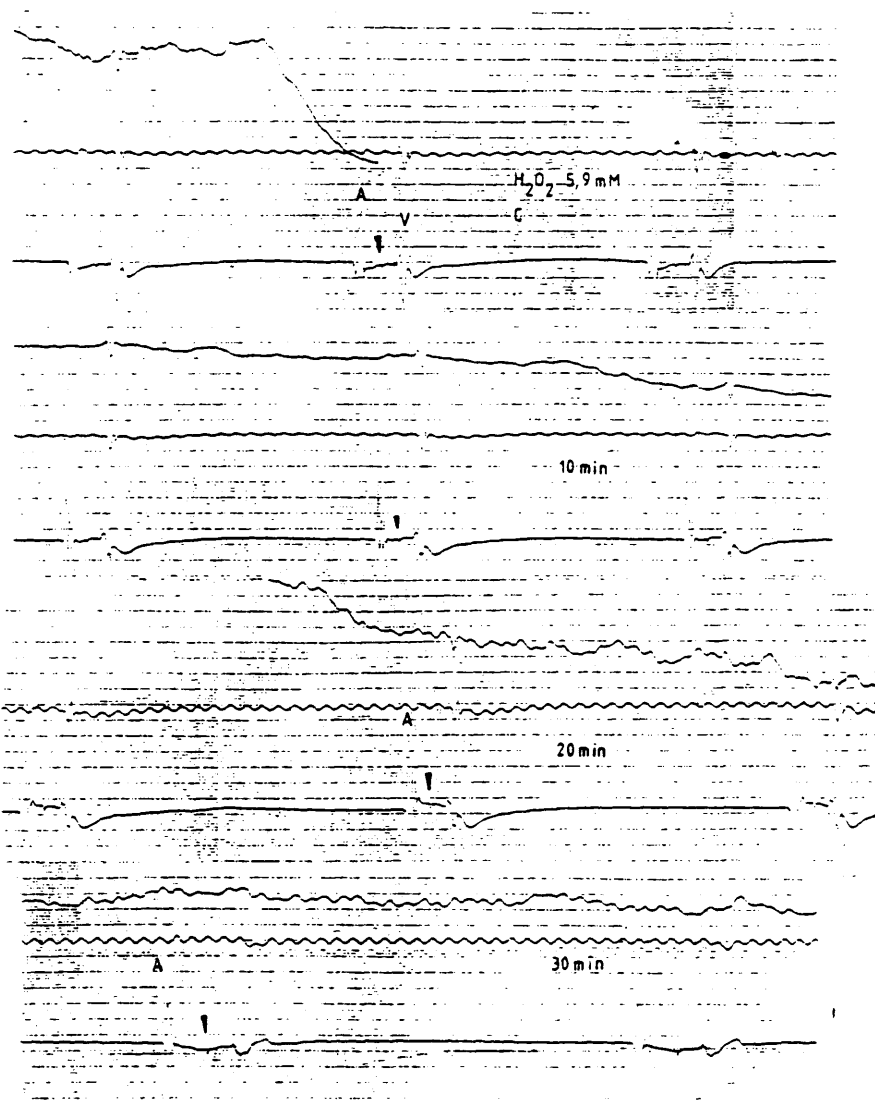


Fig.22. Preparación de H_2O_2 29 mM que acabó en asistolia que se estableció bruscamente a los 10 minutos de perfusión, no precedido de fv y/o FV, pasando a RA con corriente de lesión (T_a en "tienda de campaña") a los 13 minutos y 15 segundos. La primera mitad de la secuencia posterior al control corresponde a 5 minutos de perfusión. Símbolos con igual significado que Figs. anteriores. Ver texto para más información.

No se observó imagen franca de infarto a nivel de miocardio ventricular en los registros. Más bien insistimos en esta reducción paulatina de los voltajes del QRS y ventriculograma hasta nivel de la línea isoelectrica hasta desencadenarse FV (Fig. 23 - 1), fenómenos más manifiesto a las molaridades de 5,9 mM y 2,9 mM; aunque si hay que destacar la alta incidencia de trastornos de la repolarización ventricular, considerando los cambios de la onda T inducidos por H_2O_2 globalmente (80,95%) (n=21) (Tabla 2), variando del 60 al 100% si analizamos cada molaridad individualmente.

Hemos observado potenciales tardíos (PT) a modo de oscilaciones de la línea isoelectrica del registro endocavitario al final de la repolarización ventricular, representando un 19,04% si se considera la incidencia global (n=21), y por concentraciones individuales: 75% (n=4) con 5,9 mM y 60% (n=5) con 2,9 mM (Tabla 2). Queda muy obvia la significación estadística ($p < 0,025$) comparando indistintamente las series de 2,9 mM y 5,9 mM con las molaridades de 12 mM y 29 mM donde la incidencia de PT fue nula. El promedio de aparición en el 1º grupo fue de $35 \pm 2,89$ min y $44,66 \pm 4,92$ min en el segundo (Tabla 3). Se desencadenó FV en $35,33 \pm 8,819$ min cuando consideramos el primer grupo y $60,5 \pm 2,101$ min en el segundo grupo. A la serie con H_2O_2 5,9 mM pertenece la Fig. 23-2, mostrando imagen de EV originándose a partir de PT. Hay que subrayar que no se documentaron PT en el 20% que no fibriló con H_2O_2 2,9 mM; pero sí los hubo en el 25% que no fibriló con H_2O_2 5,9 mM. Estos últimos datos no permiten relacionar claramente por ahora ambos fenómenos, a saber: los PT y



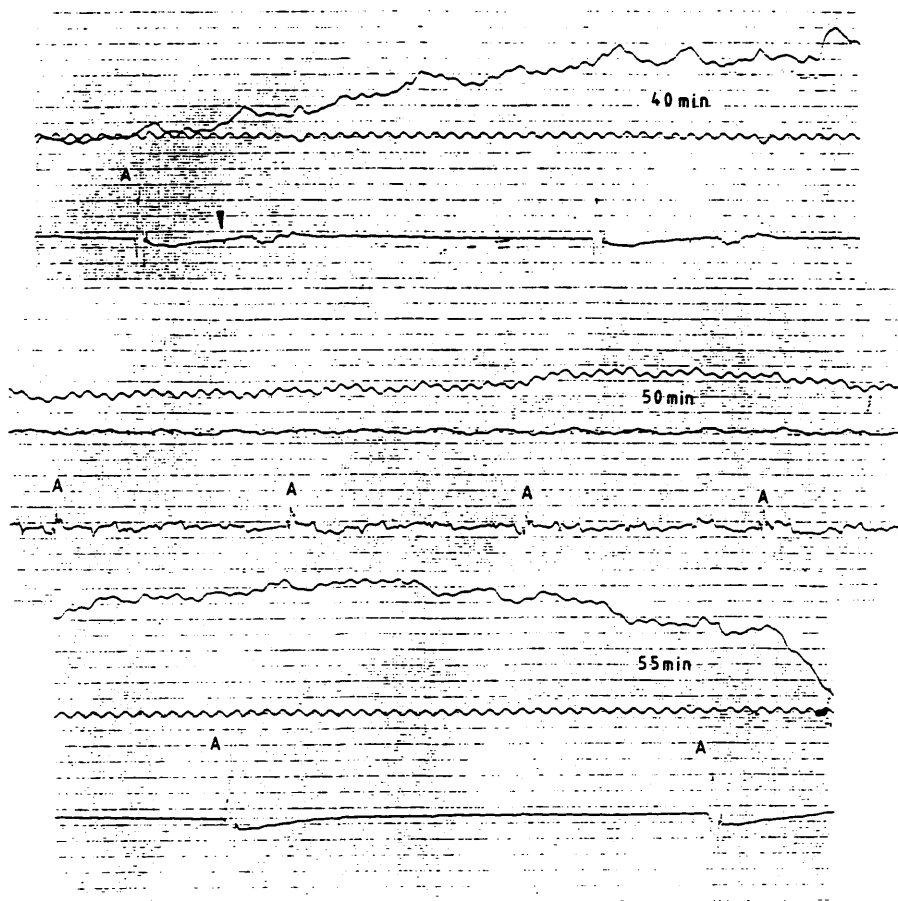
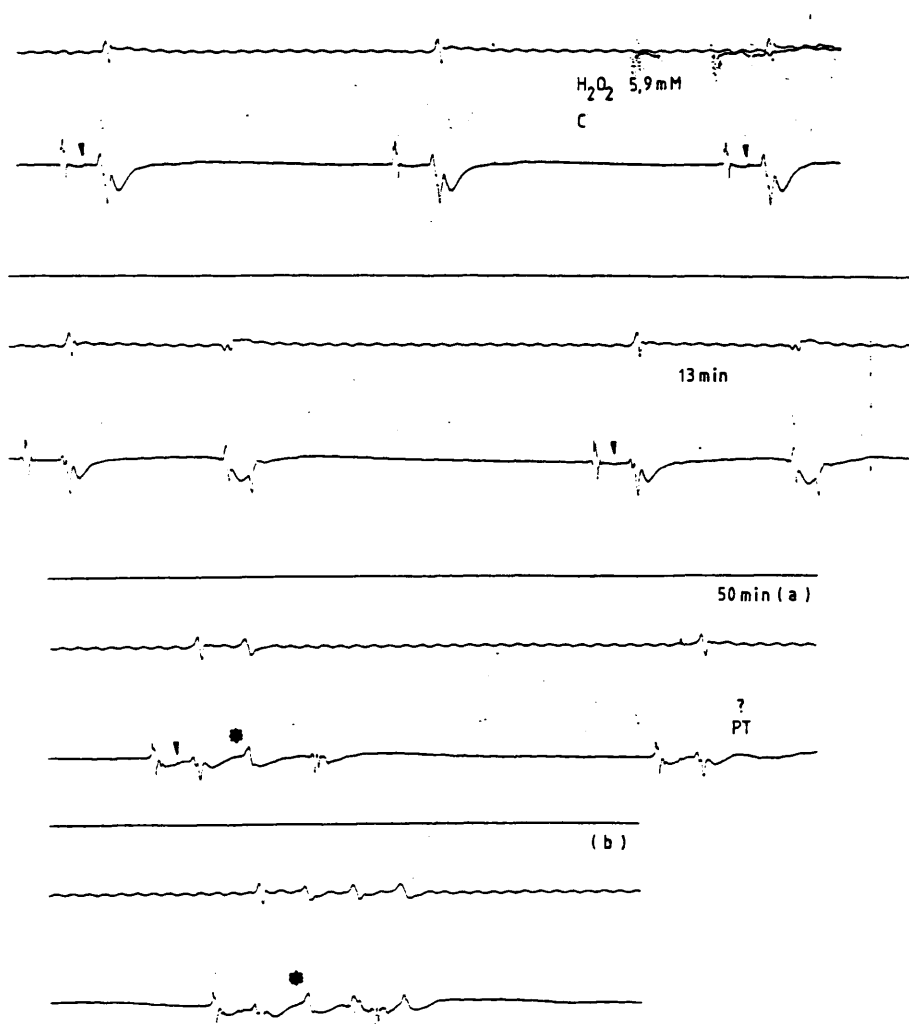


Fig.23-1. Secuencias electrocardiográficas poniendo en evidencia la disgregación progresiva de la conducción a nivel del ventrículo, hasta desencadenarse FVi a los 50 minutos de perfusión con H_2 O_2 5,9 mM aisladamente, seguido de RA a los 55 minutos. Se puede observar la corriente de lesión (Ta en "tienda de campaña"). Llama también la atención el alargamiento progresivo del intervalo AH (28 ms en control, alcanzando 112 ms a los 40 minutos de perfusión). Nótese la marcada interferencia eléctrica ambiental en el ECG. Símbolos con igual significado que Figs. anteriores. (Se amplía la información en el texto)



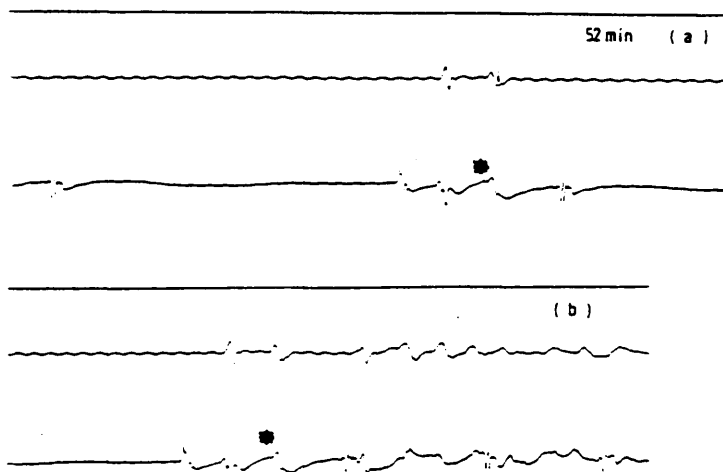


Fig.23-2. Secuencias electrocardiográficas poniendo de relieve la presencia de potenciales tardíos (PT) originando EV a los 50 minutos de perfusión con H_2O_2 5,9 mM aisladamente. A su vez estos EV originan salvas (trazado continuo a y b a los 50 minutos) degenerando a FVi a los 52 minutos (tira continua a y b). (Símbolos con igual significado que Figs, anteriores). Se amplía la información en el texto.

la FV.

En cuanto al segmento AV (desnivelamientos positivos o negativos) parece guardar cierta relación con la concentración de H_2O_2 como lo demuestra la (Fig. 24) distribuyéndose la mayor incidencia más bien a las molaridades bajas. La significación estadística se establece en relación a DMSO, Manitol y Glucosa, perfundidos aisladamente. Este dato es sugerente de efectos deletéreos de H_2O_2 a nivel del nodo AV y zonas perinodales.

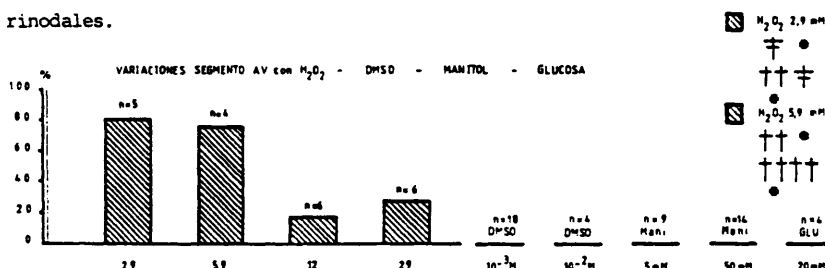


Fig.24. Este diagrama de barras muestra la relación entre desnivelamientos del "segmento AV" provocado por H_2O_2 a todas las molaridades analizadas, respecto a DMSO, Manitol y Glucosa perfundidos aisladamente. En abscisas figura la concentración, y en ordenadas los porcentajes. La significación estadística se establece para las molaridades inferiores: † $p < 0,001$; †† $p < 0,005$; * $p < 0,035$. A cada barra le corresponde las significaciones sucesivas con : - DMSO $10^{-3}M$ y $10^{-2}M$; Manitol 5 mM y 50 mM; Glucosa 20 mM; leyendo de izquierda a derecha y de arriba abajo. (Ver texto para más información)

Con los datos analizados hasta ahora, queda demostrado - que H_2O_2 produce trastornos severos de la conducción y del automatismo. La incidencia generalizada de RA con bloqueo nodal completo sin marcapasos de escape Hisiano o ventricular concuerda con la anulación del automatismo del SEC y ventricular manifestándose con la pérdida paulatina de

voltaje del QRS y ventriculograma, así como de la señal del haz de His.

Una interpretación probable de estos datos es que a las molaridades inferiores, H_2O_2 actúa escalonadamente lesionando zonas cada vez más extensas de miocardio y SEC, sumándose mecanismos electrofisiológicos y creándose mayor inhomogeneidad eléctrica (85) condición idónea para mantener arritmias ventriculares incesantes.

Arritmias en la isquemia y reperfusión

Se sometieron 10 corazones a IG distribuidos como sigue: 10 minutos (n=4), 5 minutos (n=3) y 3 minutos (n=3) seguido de 60 minutos de reperfusión, modificación de pautas establecidas en investigaciones previas (75,85).

En un principio, destaca la ausencia de FV durante los tiempos de IG de 10 minutos, 5 minutos y 3 minutos (Fig. 8 - b4) $p < 0,035$ (n=10), considerando el desencadenamiento de disrritmias variadas en los primeros minutos de la reperfusión, seguido de FVi en el 100% (n=4) del grupo reperfundido después de 10 minutos de isquemia.

Analizando la figura 13 se puede apreciar la desviación hacia los 10 minutos de IG del pico de incidencia global de disturbios del

ritmo y FV acompañando a la reperfusión. Otro dato relevante es la incidencia nula de FV con la reperfusión en los protocolos de los 3 minutos y 5 minutos de isquemia, alcanzando el 100% cuando se alarga ese tiempo hasta 10 minutos ($p < 0,035$). Cuando se considera la incidencia general de arritmias EV (bigeminismos, dobletes) TV con exclusión de la FV, la significación se mantiene ($p < 0,050$) entre los grupos de los 10 minutos y 3 minutos de IG y reperfusión. (Fig. 13).

1.- Serie IG 10 minutos y reperfusión.

Hay una clara relación temporal, siendo los 10 minutos una "fase crítica" durante la cual se establecen posiblemente daños celulares y cambios metabólicos importantes responsables de inhomogeneidad eléctrica de espacio y de tiempo, condición idónea para desencadenar arritmias severas llevando a la FV.

Se pudo notar bradicardia sinusal significativa en el 75% ($n=4$) de los experimentos, $p < 0,001$ respecto al control, al final de los 10 minutos de IG (Fig. 14 - a), efecto que se mantuvo en el 50% ($n=4$) al inicio de la reperfusión que alcanzó escasamente 6 minutos debido a la presentación precoz de FV (Tabla 3). El 50% ($n=4$) de las preparaciones presentó bloqueo AV (BAV) de 2º grado 2:1 antes de concluir los 10 minutos de IG, bloqueo suprahisiano de primer grado en el 75% ($n=4$) no observando ninguno con la reperfusión. Se vió actividad ectópica ventricular en un 25% ($n=4$), dato que se duplicó con la reperfusión.

Otro 25% (n=4) de corazones presentó disociación AV (DAV) entendiendo como tal: actividad eléctrica auricular y ventricular independientes con origen en el SEC o ectópico siempre secundario a trastornos variados del ritmo como bradicardia sinusal intensa, aceleración de focos ectópicos subsidiarios, bloqueo a nivel de la unión AV o combinación de los mismos con capturas y latidos de fusión, siendo el bloqueo AV incompleto. En relación a lo dicho, puede haber DAV completa con BAV incompleto; pero el BAV completo se acompaña siempre de DAV completa (165).

En otro 25% se documentó RA de presentación brusca con bloqueo nodal completo a los 6 minutos de isquemia. A pesar de estos episodios de bloqueo nodal, se completaron los 10 minutos de isquemia previstos en el protocolo (Fig. 5-b).

Las preparaciones no alcanzaron los 60 minutos previstos de reperfusión, fibrilando irreversiblemente el 100% (n=4). (Fig. 8-b1) (Fig. 11), en un promedio de $6,25 \pm 1,138$ min. y el 50% precedido de flutter ventricular (fv). (Tabla 3). Además, las arritmias severas se desencadenaron prácticamente al iniciar la reperfusión, en $1,50 \pm 0,288$ min, siendo por lo común: EV (incluido dobletes, bigeminismos), 50% (n=4), TV 75% (n=4) (sostenido y no sostenido, incluso con morfología bidireccional), DIV 100% (n=4). Destaca un 50% de RIVA.

Se pudo documentar 75% de BAV de tercer grado y DAV en igual pro-

porción durante la reperfusión. Insistimos en que las arritmias y FVi - se iniciaron significativamente más precozmente que H_2O_2 12 mM y 29 mM.

Catalogando las variaciones morfológicas de los electrogramas y del ECG durante la reperfusión hay que reseñar distorsión y ensanchamiento del QRS con pérdida de voltaje en el 100% de los casos (Tabla 2). Hubo aplanamiento y ensanchamiento de la onda T en un 50% de casos ($n=4$) durante el periodo de isquemia; infra o supradesnivelamiento del segmento AV en un 25%. El QRS sufrió un 80% de reducción de su voltaje inicial en el 50% durante la isquemia pasando al 100% durante la reperfusión. Esta última circunstancia podría interpretarse como depresión severa del automatismo y batmotropismo ventriculares, remedando los efectos de H_2O_2 perfundido aisladamente. También se distorsionaron los electrogramas intracavitarios: el auriculograma en el 50% ($n=4$) y en igual proporción el ventriculograma durante el periodo de isquemia, afectando al 100% durante la reperfusión (Tabla 2).

Como observación general, recalcamos la ausencia de PT en ambas fases del protocolo. La incidencia de Ta fue del 25% durante la isquemia manteniéndose en 75% durante la reperfusión.

Sigue siendo obvia las peores consecuencias de la reperfusión analizando globalmente este conjunto de datos. Destaca también la presencia de lesión auricular de forma similar a lo ocurrido con H_2O_2 aisladamente, y trastornos de la repolarización ventricular.

2.- Series de IG de 5 y 3 minutos, y perfusión.

Lo más llamativo de las series de los 5 y 3 minutos de IG, es la incidencia nula de FV durante los 60 minutos de perfusión - ($p < 0,035$) (Fig. 12-1 y 2) comparado con la serie de los 10 minutos de IG y perfusión (Fig. 8 b). Hubo baja incidencia de las arritmias ventriculares (Tabla 2), limitándose a EV aislados en el 66,66% ($n=3$) de casos con un episodio de TV no sostenida, y DAV en un 33,33% con 5 minutos de isquemia, presentándose desde el primer minuto de la perfusión (Tabla 3). Se recordará también la ausencia significativa de FV durante los periodos de 3, 5 y 10 minutos de IG (Fig. 8-b4).

Aquí también se vió desnivel del segmento AV en tienda de campaña durante el periodo isquémico en un 66,66%, grupo de los 5 minutos de IG, igual que en la serie de los 3 minutos. Se pudo documentar un episodio de bloqueo nodal con Ta al concluir los 5 minutos de isquemia - global en un 33,33% de casos. Es interesante señalar que los electrogramas intracavitarios y ECG recuperaron el voltaje de control durante la perfusión en ambos protocolos de los 3 y 5 minutos de IG.

Con 3 minutos de IG y Rep. destacó la baja incidencia de arritmias ventriculares, manifestándose como EV aislados y DAV en el 33,33% ($p < 0,050$) si se considera el grupo de los 10 minutos de isquemia global que presentó con la perfusión 100% de incidencia en arritmias ventriculares severas,

amén de FVi (Fig. 13). Tampoco se encontró la Ta sugerente de lesión auricular durante la reperfusión precedida de 5 minutos de IG, y en ninguna fase del protocolo en la serie de los 3 minutos de IG. No se pudo documentar PT en ninguna de las series de los 5 y 3 minutos de IG y reperfusión.

Con estos datos a la vista, se insiste sobre el papel fundamental del tiempo de IG (siendo 10 minutos el punto crítico) y las peores consecuencias de la reperfusión como lo demuestran las Figs. 11, 12 y 13.

Arritmias en la serie de DMSO y H_2O_2

Una vez concluidos los 30 minutos de perfusión con DMSO, reconocido "barredor" de radicales, hidróxilo (HO^\bullet) (157), se procedió añadiendo H_2O_2 , sucediéndose disritmias similares a las encontradas con peróxido perfundido aisladamente; indistintamente de la concentración estudiada. Interesantemente, ninguno de los corazones llegó a FV ($n=4$) cuando se emplearon las dosis de 10^{-3} M y 12 mM para el DMSO y peróxido respectivamente. ($p < 0,012$ respecto a H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente). (Tabla 2). (Fig. 8-c2) (Fig. 16-2b'). Al contrario el 71,42% fibriló irreversiblemente ($n=7$) con H_2O_2 29 mM en un promedio de $11,857 \pm 1,142$ min recuperando el RS y conducción AV el 28,51% del efectivo (incidencia global de FV) (Fig. 8-cl) (Fig. 16-2a') en un promedio de $2,5 \pm 0,5$ min (Tabla 3). Queda evidente la protección de DMSO frente a H_2O_2 a las concentraciones usadas, forzando la recuperación de RS frente a la

molaridad más bien alta de 29 mM que provocó FV irreversible en el 83,33% (n=6) de la serie donde se perfundió aisladamente (Fig. 8 -a).

Pasando al análisis más detallado de las diferentes arritmias, resalta la tendencia a reducirse la incidencia de trastornos eléctricos supraventriculares a las concentraciones superiores de H_2O_2 (29 mM y 12 mM más DMSO 10^{-3} M) respecto a H_2O_2 aisladamente a las mismas molaridades (Tabla 2). Así pues, se contabilizaron 71,42% (n=7) de casos de bradicardia sinusal (BS) con DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 29 mM (ns) respecto a H_2O_2 aislado 29 mM. Se dió un 50% (n=4) en la serie con DMSO y H_2O_2 12 mM, tampoco significativo comparado con H_2O_2 12 mM aislado. Se documentó un caso de bloqueo sinoauricular (BSA) tipo 2:1 (14,28%) con DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 29 mM (n=7) frente a 16,66% (n=6) con H_2O_2 aislado 29 mM (ns). La incidencia fue nula tanto para DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 (12 mM) y H_2O_2 12 mM aisladamente. La incidencia de ectopía ventricular fue casi igual: 71,42% (n=7) y 75% (n=4) para ambas molaridades de H_2O_2 con DMSO y no significativo respecto a H_2O_2 aislado. Destacaron crisis de TV polimorfas en un 42,85% (n=7) con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM, frente a un 25% de TV tipo ritmo idioventricular acelerado (RIVA) (n=4) con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM, no significativo confrontando los efectos de H_2O_2 aislado a igualdad de concentraciones. Hubo un 25% de TA o fa con esta última serie de DMSO, tampoco significativo.

Resultados similares se observaron con los disturbios de la conducción: 57,14% de casos (n=7) con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM con , bloqueo suprahisiano de 1º grado versus 50% (n=4) con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM (ns), frente a H_2O_2 perfundido aisladamente a las mismas

molaridades. La diferencia es más llamativa a grados superiores de bloqueos. Efectivamente con BAV de 2º grado (incluyendo Wenckebach, Mobitz II y 2:1) se dió un 28,57% (n=7) con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM y 25% (n=4) con DMSO a la misma molaridad y H_2O_2 12 mM (ns) respecto a la incidencia observada con H_2O_2 aislado a molaridades equiparables. Pero la significación es clara en los bloqueos de 3º grado con RA y bloqueo nodal completo: 0% con DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM (n=4) respecto al 100% con H_2O_2 12 mM aislado (n=6) ($p < 0,012$). (Tabla 2). Con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM se dió un 57,14% de RA, ns respecto a H_2O_2 29 mM aislado.

Las arritmias se manifestaron a los $8,714 \pm 0,892$ min (DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 29 mM) y $7,666 \pm 1,452$ min (DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM) algo más tardiamente, comparando con las series de H_2O_2 aisladamente a las mismas molaridades (ns). El DMSO 10^{-3} M no influyó significativamente en la precocidad de las arritmias, frente a H_2O_2 12 mM perfundido sucesivamente, aunque sí inhibió la degeneración hacia la FV en el 100% de los casos (n=4) ($p < 0,012$) (Tabla 2) y forzó la recuperación de RS en el 28,57% (n=7) con H_2O_2 (29 mM) (Fig. 8-c 1 y 2). (Tabla 2). En este último grupo se desencadenó FV en un promedio de $11,857 \pm 1,142$ min., restableciéndose de nuevo el ritmo sinusal en $2,5 \pm 0,50$ min. Encontramos una similitud llamativa con el tiempo de aparición de FV con H_2O_2 aisladamente y a la misma concentración ($11,8 \pm 1,113$ min) como se puede comprobar en la Tabla 3.

En cuanto a los cambios morfológicos, sobresale la ausencia significativa de Ia en tienda de campaña, marcando la protección a nivel auricular con DMSO 10^{-3} M frente a H_2O_2 (12 mM) comparado a un 66,66% (n=6) con H_2O_2 aislado 12 mM ($p < 0,025$). Hubo un 57,14% (n=7) con DMSO 10^{-3} M

y H_2O_2 29 mM, ns respecto a H_2O_2 29 mM aislado que presentó un 100% (Tabla 2). Al contrario, no aparecieron PT a ninguna de las concentraciones de H_2O_2 en cuestión (29 mM y 12 mM), pero si un 25% (n=4) en el grupo de DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM (ns), manifestándose a los 35 minutos. (Tablas 2 y 3). Recordemos que este intervalo se acerca a la media de presentación con H_2O_2 perfundido aisladamente: $35 \pm 2,89$ min (5,9 mM) con la diferencia de no haberse registrado FV en el grupo con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 (12 mM) añadidos sucesivamente. No se observaron PT en la serie de DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 29 mM. En cuanto a la onda T de repolarización ventricular (desnivelamientos positivos o negativos) se pudo observar una tendencia a la reducción de estos trastornos en la serie de DMSO 10^{-3} M + H_2O_2 12 mM frente a H_2O_2 12 mM aislado; dato que adquirió significación con DMSO a la misma molaridad frente a H_2O_2 29 mM ($p < 0,012$) (Tabla 2). Se siguió observando la tendencia a mantenerse los disturbios de la conducción intraventricular (ensanchamiento de QRS con reducción de voltaje) manifestándose también a nivel del ventriculograma intracavitario a pesar de la presencia de DMSO 10^{-3} M frente a H_2O_2 12 mM, no significativo respecto a los efectos de H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente. Pero a pesar de estos trastornos a nivel del SEC del corazón, incluyendo los desnivelamientos del "segmento" AV; recuérdese que no se desencadenó FV en ninguno de los corazones, siendo la protección total ($p < 0,012$) considerando el grupo de DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM respecto a H_2O_2 12 mM aisladamente (Fig. 8-a y c-2), habiéndose recuperado el RS y conducción AV frente a H_2O_2 29 mM.

Analizando las dos series comparativas donde se mantuvo la perfusión de DMSO ininterrumpidamente, una primera diferencia salta a la vista con el grupo de experimentos donde el DMSO se retiró del circuito antes de añadir H_2O_2 : se presentaron las arritmias a los $12,666 \pm 1,452$ min con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM ($p < 0,025$) por una parte y por otra a los $10,25 \pm 2,393$ min (ns) cuando se incrementó el DMSO a 10^{-2} M respetando la misma molaridad del H_2O_2 , con lo cual se atrasó significativamente el desencadenamiento de los disturbios de ritmo cuando se perfundió con DMSO 10^{-3} M ininterrumpidamente ($p < 0,025$) respecto a la serie de H_2O_2 12 mM aisladamente. El incremento de la molaridad de DMSO a 10^{-2} M no mejoró este dato obtenido con DMSO 10^{-3} M. Una segunda diferencia es que las preparaciones de ambas series de DMSO perfundido ininterrumpidamente fibrilaron en un promedio de 21 minutos (33,33% y $n=3$) precedido de fv, y $19 \pm 2,309$ min (50% y $n=4$) también precedido de fv, recuperándose en 60 y 30 segundos respectivamente; el 100% ($n=3$) en el grupo de DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM (Fig. 16-3a') y el 25% de los 50% que fibrilaron en el grupo de DMSO 10^{-2} M más H_2O_2 12 mM (Fig. 8 - d1 y 2). Además sobresale el retraso significativo en la aparición de FV ($p < 0,050$) comparado con H_2O_2 12 mM aisladamente. (Tabla 3). Comparando en terminos de irreversibilidad de la FV, destaca la significación $p < 0,012$ (DMSO 10^{-3} M + H_2O_2 12 mM, 0% versus H_2O_2 12 mM aislado, 100%). En cuanto al grupo de DMSO 10^{-2} M + H_2O_2 12 mM fibriló irreversiblemente solo el 25% ($n=4$) lo que nos deja un 75% de corazones funcionando en RS durante los 60 minutos de observación frente al 100% de irreversibilidad en el grupo de H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente, dato también significativo (Fig. 8-d2) (Fig.8-a), —

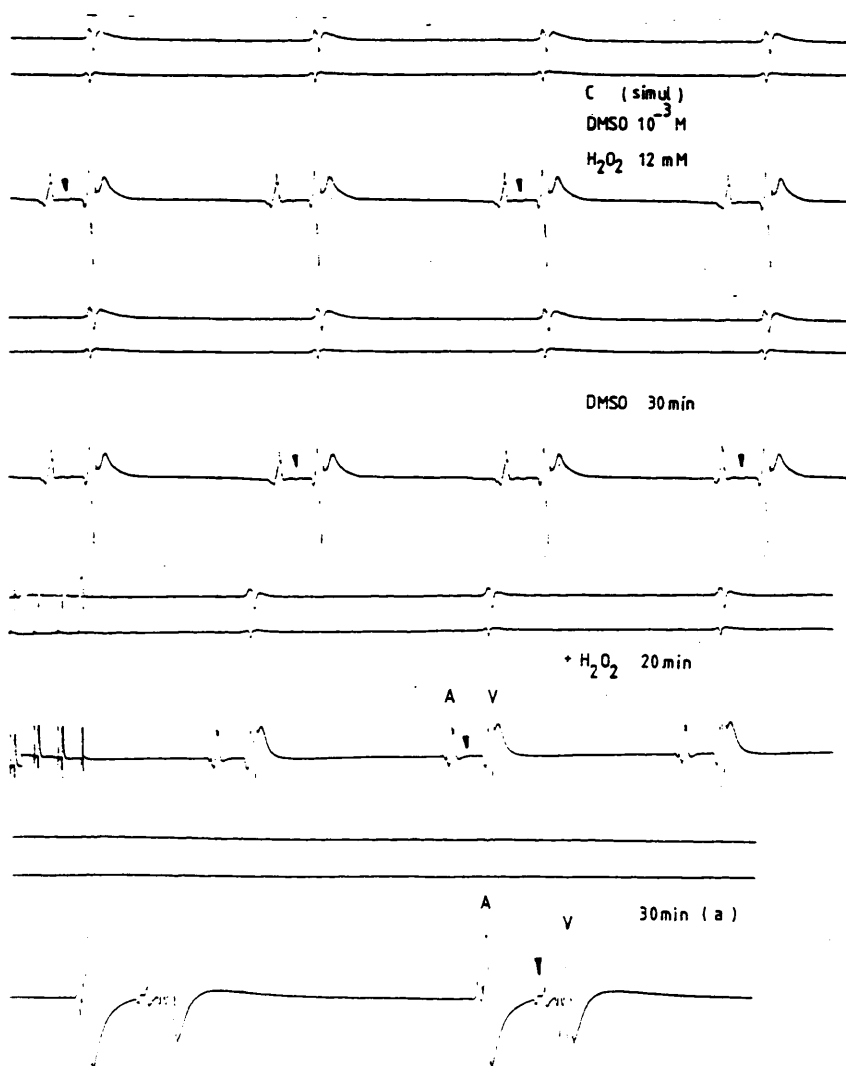
$p < 0,035$. No hay diferencia significativa en la incidencia de FV entre las 2 series de $\text{DMSO} + \text{H}_2\text{O}_2$ mantenidos en circuito ininterrumpidamente (independientemente de las concentraciones de ambas sustancias utilizadas). Sí, se estableció en el caso de $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M}$ y H_2O_2 29 mM añadidos sucesivamente al circuito de perfusión respecto a $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M} + \text{H}_2\text{O}_2$ 12 mM del mismo protocolo ($p < 0,035$) (Tabla 2) y (Fig. 8-c 1 y 2). Recordar la pronta recuperación ($2,50 \pm 0,50$ min) de RS y conducción AV a pesar de esta alta concentración de H_2O_2 (29 mM) actuando con $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M}$. (Tabla 3). Queda una vez más evidenciada la protección prestada por DMSO frente a la FV provocada por H_2O_2 .

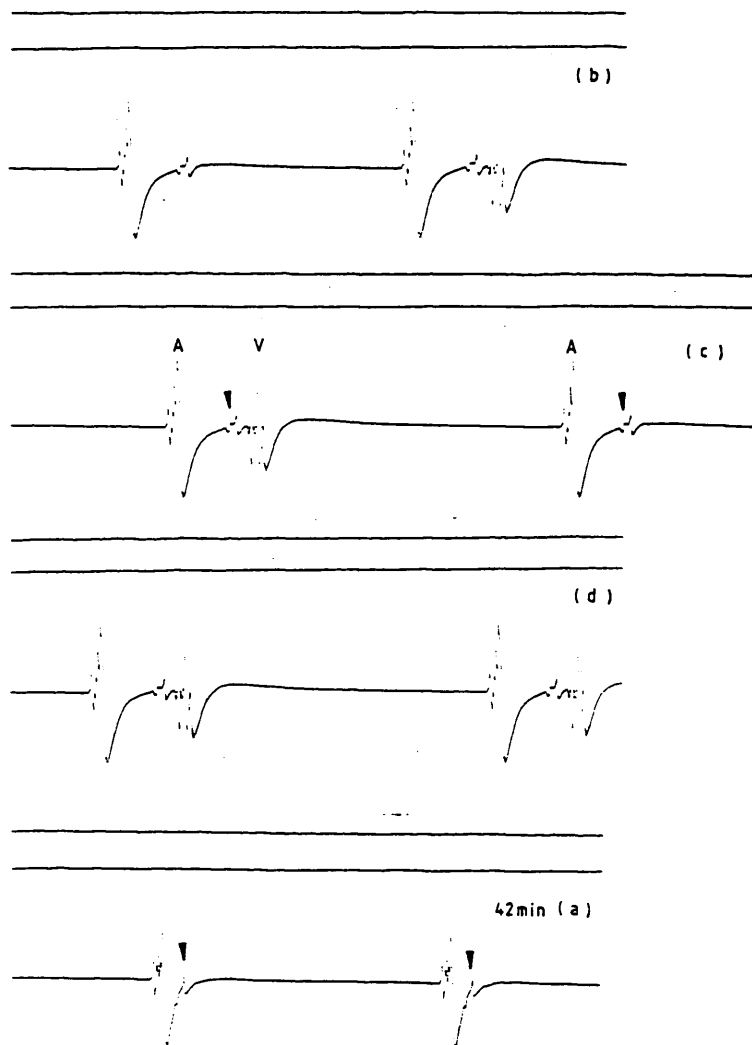
Otra diferencia a subrayar es la reducción de ciertas arritmias supraventriculares con DMSO mantenido en circuito durante todo el proceso, significativo en ciertos casos. Destaca la ausencia de BS ($p < 0,035$), AS - (ns), TA (ns), pero apareció BSA de tercer grado con parada auricular y ritmo de escape ventricular (33,33%), y 2:1 (33,33%) con $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M} + \text{H}_2\text{O}_2$ 12 mM respecto a H_2O_2 12 mM aislado. Se pudo registrar TS (25%, $n=4$, ns) y EA (25%, $n=4$, ns) al incrementar la molaridad de DMSO a 10^{-2} M perfundido con H_2O_2 12 mM respecto a H_2O_2 12 mM aislado. A niveles más distales, solamente se dió un 33,33% ($n=3$) de bloqueo infrahisiano completo presentando RA con $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M}$, frente al 25 % (ns) de RA y 75% (ns) de bloqueo de 3º grado con $\text{DMSO } 10^{-2} \text{ M}$, de los cuales un 25% también infrahisiano e incompleto (25%, $n=4$); ninguno de estos datos con significación estadística confrontando los efectos en estas 2 series de $\text{DMSO } 10^{-3} \text{ M}$ más H_2O_2 12 mM y $\text{DMSO } 10^{-2} \text{ M}$ más H_2O_2 12 mM entre

ellas, pero sí respecto a H_2O_2 12 mM aislado ($p < 0,035$) (Tabla 2). A ambas concentraciones, predominaron los ritmos ectópicos hisianos y ventriculares, (DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM perfundidos conjuntamente), con un 100% ($n=3$) de escapes hisianos (eH) ($p < 0,035$) en la primera serie, de los cuales un 25% como taquicardia hisiana conducida al ventrículo derecho (Fig. 25). Se pudo documentar un 50% ($n=4$, ns), con DMSO 10^{-2} M y H_2O_2 siempre a la misma concentración de 12 mM. Recalquemos que estos episodios se caracterizan por presentarse pasados los 40 minutos de perfusión. Los EV (ritmos bigeminados incluidos) se observaron en ambas series: 66,66% ($n=3$) y 100% (ns) respectivamente, respecto a H_2O_2 12 mM. Se dió un 50% ($n=4$) de DAV en el grupo de DMSO 10^{-2} M y el fenómeno de DIV fue del 33,33% en la serie con DMSO 10^{-3} M y del 50% con DMSO 10^{-2} M (ns). Hubo también episodios breves de asistolia de 2 minutos y 1 segundo de duración en el mismo orden de molaridades que vamos siguiendo: 33,33% ($n=3$) DMSO 10^{-3} M, y 25% ($n=4$, ns) DMSO 10^{-2} M recuperando el RS a posteriori, alternándose además salvas de TV. La comparación estadística de estos últimos datos se hace frente a H_2O_2 12 mM aislado.

Por último, se documentaron PT a los 15 minutos de añadir el H_2O_2 12 mM al DMSO 10^{-2} M en un 25% ($n=4$, ns) que presentó dos episodios de TV y fv (medio segundo de duración) a los 18 minutos, pero no fibriló. Entró en RA bruscamente a los 30 minutos con bloqueo nodal completo y aparición de Ia en tienda de campaña. Otro experimento interesante de este mismo grupo tampoco entró en FV, presentando un episodio de fv (1 minuto de duración) a los 28,30 minutos de haber añadido H_2O_2 al DMSO.

Con estos datos analizados en conjunto, sobresale el efecto





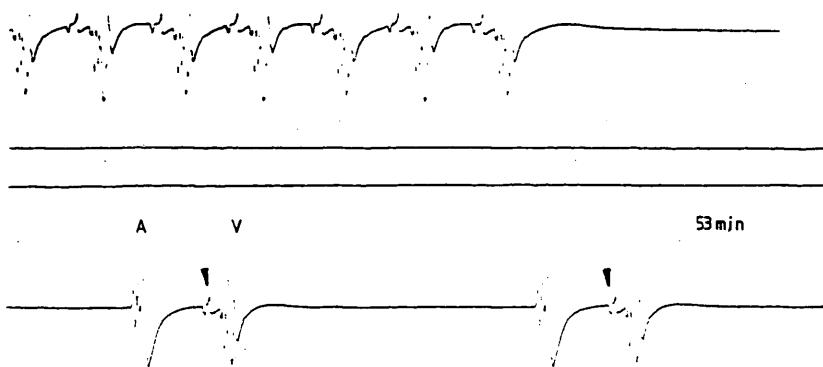
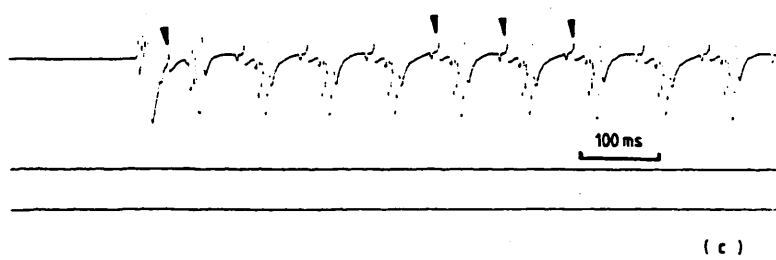
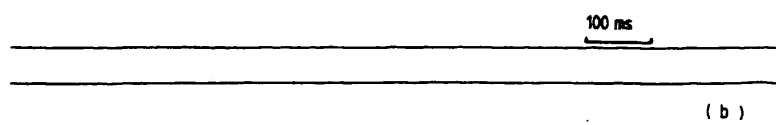


Fig.25. Estas secuencias electrocardiográficas recalcan el efecto protector de DMSO $10^{-3}M$ perfundido simultáneamente (simul) con H_2O_2 12 mM (añadiendo H_2O_2 después de 30 minutos de perfusión con DMSO aisladamente). No se presentó fv y/o FV, RA o asistolia durante cerca de 60 minutos de observación después de añadir H_2O_2 al DMSO. Se puede observar el cambio de morfología de los electrogramas intracavitarios a partir de los 30 minutos de haber añadido H_2O_2 (secuencia continua en a, b, c, d). Hay un breve episodio de conducción 2:1 en b y c. A los 42 minutos se presenta bloqueo infrahisiano con una salva de TH conducida a VD (tira continua a, b, c), iniciándose latidos sinusales a los 50 minutos con restablecimiento de RS a los 53 minutos. No se observa actividad ventricular aparente a nivel periférico. (Símbolos con igual significado que Figs. anteriores).

protector de DMSO $10^{-3}M$ frente a la FV desencadenada por H_2O_2 , significativo respecto a H_2O_2 12 mM, amén de reducir las arritmias tanto supra como ventriculares y trastornos de la conducción; significativamente en los casos de BAV de 3º grado, RA, DIV y corriente de lesión auricular. Además mostró la capacidad para contrarrestar la actividad nociva de H_2O_2 a la molaridad muy superior de 29 mM. Los posibles mecanismos involucrados se abordarán en su momento.

Arritmias en la serie de Manitol y H_2O_2

1.- En un principio, se analizó el comportamiento de Manitol 5 mM/ H_2O_2 12 mM añadidos sucesivamente al sistema de perfusión (Fig.5-c).

Destacó la tendencia a reducirse la incidencia de arritmias supraventriculares, distribuyéndose según se observa en la Tabla 2: 75% (n=4) de BS, un 25% de BSA de 2º grado y otro 25% de marcapaso errante, ninguno significativo respecto a H_2O_2 12 mM. No se pudo anotar ningún episodio de TS, EA, TA, TU y eH. Tampoco hay significación estadística comparando estos datos con las series de DMSO $10^{-3}M$ más H_2O_2 12 mM ó 29 mM perfundidos sucesivamente. Los trastornos del ritmo surgieron en un promedio de $5,25 \pm 1,314$ min, recordándonos los efectos de H_2O_2 aislado a la misma molaridad y significativamente más precoz respecto a DMSO $10^{-3}M$ perfundido ininterrumpidamente con H_2O_2 12 mM ($12,666 \pm 1,452$ min, $p < 0,015$); datos figurados en la Tabla 3.

No diferencias significativas se vieron con ~~ciertas arritmias ventricula-~~ res, siendo el 100% (n=4) (ns) de EV, 75% (ns) de TV (incluyendo un caso de RIVA) con excepción de DIV 100% ($p < 0,035$) y FVi (Fig. 8 -e1) - (Fig. 17 - 2a') apareciendo en un lapso de $13,75 \pm 0,75$ min (100%) - $p < 0,035$, dos de estos episodios precedidos de fv, con Manitol 5 mM y H_2O_2 12 mM; comparado con un 75% (n=4) de EV, 25% de RIVA y ausencia de FV en la serie de DMSO 10^{-3} M con H_2O_2 12 mM añadidos sucesivamente (Tabla 2). (Fig. 8 - e1) (Fig. 8-c2). Es llamativo el hecho de que a pesar de la previa acción de Manitol, la FV se presentó en un tiempo equiparable a H_2O_2 aislado a la misma molaridad, y recalcando una vez más su carácter irreversible en el 100% de las preparaciones.

Los trastornos de la conducción quedaron en un 25% (ns) de bloqueo suprahisiano de primer grado, y el 75% ($p < 0,035$) de RA con bloqueo nodal completo con Manitol 5 mM + H_2O_2 12 mM, frente al 50% (n=4) de bloqueo suprahisiano de 1º grado, 25% de bloqueo de segundo grado (uno de tipo Mobitz II) y ninguno con bloqueo nodal completo en el grupo del DMSO 10^{-3} M + H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente (Tabla 2). Se dieron varios episodios de asistolia con Manitol 5 mM + H_2O_2 12 mM.

En lo que atañe a los cambios de los patrones electrocardiográficos, se registró la Ia en tienda de campaña acompañando al RA en un 75% (n=4) ($p < 0,035$) con Manitol 5 mM más H_2O_2 12 mM y desnivel de la onda T manifestando trastornos de la repolarización ventricular en el 50% (ns) respecto a DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM perfundidos también sucesivamente. Hubo reducción de voltaje del QRS hasta el 80% en un 25% ($p < 0,035$) en menor

proporción que con DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM, y distorsión de los electrogramas auricular y ventricular en el 75% (n=4) ns. Estos cambios morfológicos se acentuaron paulatinamente hasta el desencadenamiento de FV.

Señalemos la ausencia de PT en la serie de Manitol 5 mM con H_2O_2 12 mM, mientras sí los hubo cuando se experimentó con DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM (25%, ns).

Cuando se incrementó la molaridad del Manitol a 50 mM, sin variar el H_2O_2 , siguió la misma distribución de arritmias supraventriculares, con tendencia a disminuir determinados tipos y aumentar otros, respecto a H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente (Tabla 2). Se manifestó un 75% (n=4) ns de BS con ausencia total de taquicardia (ns). Destacaron en esa serie: eH (25%, n=4, ns) y EA en otros 25% (ns), iniciándose las arritmias a los $10,66 \pm 2,333$ min, significativamente más tardíamente que con Manitol 5 mM más H_2O_2 12 mM ($p < 0,050$) (Tabla 3), y sin mejora frente a las series correspondientes de DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM o 29 mM (según el mismo protocolo de perfusión sucesiva de estas sustancias). No se apreció ninguna diferencia significativa respecto a H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente (Tabla 3).

Entonces el Manitol (independientemente de la concentración) no influye en el tiempo de aparición de las arritmias comparado con los efectos de H_2O_2 12 mM aisladamente; incluso se presentan más precozmente (significativo) confrontando los efectos de Manitol 5 mM + H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente, respecto a DMSO 10^{-3} M y H_2O_2 12 mM, manteni-

dos en circuito simultáneamente ($p < 0,015$, Tabla 3).

De forma llamativa se mantuvo la aparición de RIVA (75%, $n=4$), $p < 0,025$ respecto a H_2O_2 12 mM aisladamente (Tabla 2), FV y DIV (Fig. 17-2b') en el 100% de los corazones, apareciendo en un promedio de $21 \pm 2,159$ min significativamente más tardío ($p < 0,025$) tanto frente a la serie anterior de Manitol 5 mM más H_2O_2 12 mM como respecto a H_2O_2 12 mM perfundido aisladamente (Tabla 3). La FV fue irreversible en un 75% del efectivo ($n=4$) (Fig. 8 - e2) no significativo respecto a la serie de Manitol 5 mM más H_2O_2 12 mM (Fig. 8 - e1) pero sobresaliendo la significación ($p < 0,035$) comparado con DMSO $10^{-3}M$ más H_2O_2 12 mM mostrando incidencia nula de FV (Fig. 8 - c2). Como trastorno del dromotropismo, se dió un 100% de RA con bloqueo nodal completo, $p < 0,035$ respecto a DMSO $10^{-3}M$ más H_2O_2 12 mM, y en igual proporción que H_2O_2 12 mM aisladamente. Hay que sumar también un 100% de experimentos con Ia en tienda de campaña (Fig. 17-2b'), 75% con cambios de la onda T manifestándose como corriente de lesión ventricular, y supradesnivelamiento del segmento AV en un 25%. Se redujo el voltaje de QRS hasta un 70% en 25% ($n=4$) de las preparaciones asociado a reducción paralela del ventriculograma. Todos estos últimos datos muestran unas proporciones similares respecto a H_2O_2 12 mM aisladamente.

II.- Analicemos las respuestas de Manitol 50 mM perfundido ininterrumpidamente junto con H_2O_2 12 mM añadido a los 30 minutos de iniciar el experimento, siguiendo el mismo protocolo diseñado para el DMSO (Fig. 5d).

Las respuestas del automatismo, dromotropismo y batmotropismo fueron globalmente superponibles a la serie anterior realizada a idénticas concentraciones, pero con ambas sustancias añadidas sucesivamente (Fig.5c)

Entre las arritmias supraventriculares, hubo un 25% (n=4) de BSA tipo 2:1 (ns) y otro 25% de EA (ns). No se desencadenaron disritmias tales como TS, TA en ningún momento. Sucedieron eH en un 25%. En este grupo de arritmias, el único dato significativo fue la ausencia de BS respecto a la serie de Manitol 50 mM más H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente ($p < 0,035$) y también frente a H_2O_2 12 mM aisladamente. (Tabla 2). Los disturbios del ritmo aparecieron a los $7,75 \pm 1,493$ min incluso más precozmente que en la serie de Manitol previamente mencionada, pero a la vez superponible al tiempo de aparición en la serie de H_2O_2 12 mM aisladamente. Queda entonces evidente que a diferencia de DMSO 10^{-3} M, el Manitol (incluso a mayor molaridad) no modifica la precocidad de las disritmias inducidas por H_2O_2 12 mM aisladamente como se comprueba en la Tabla 3.

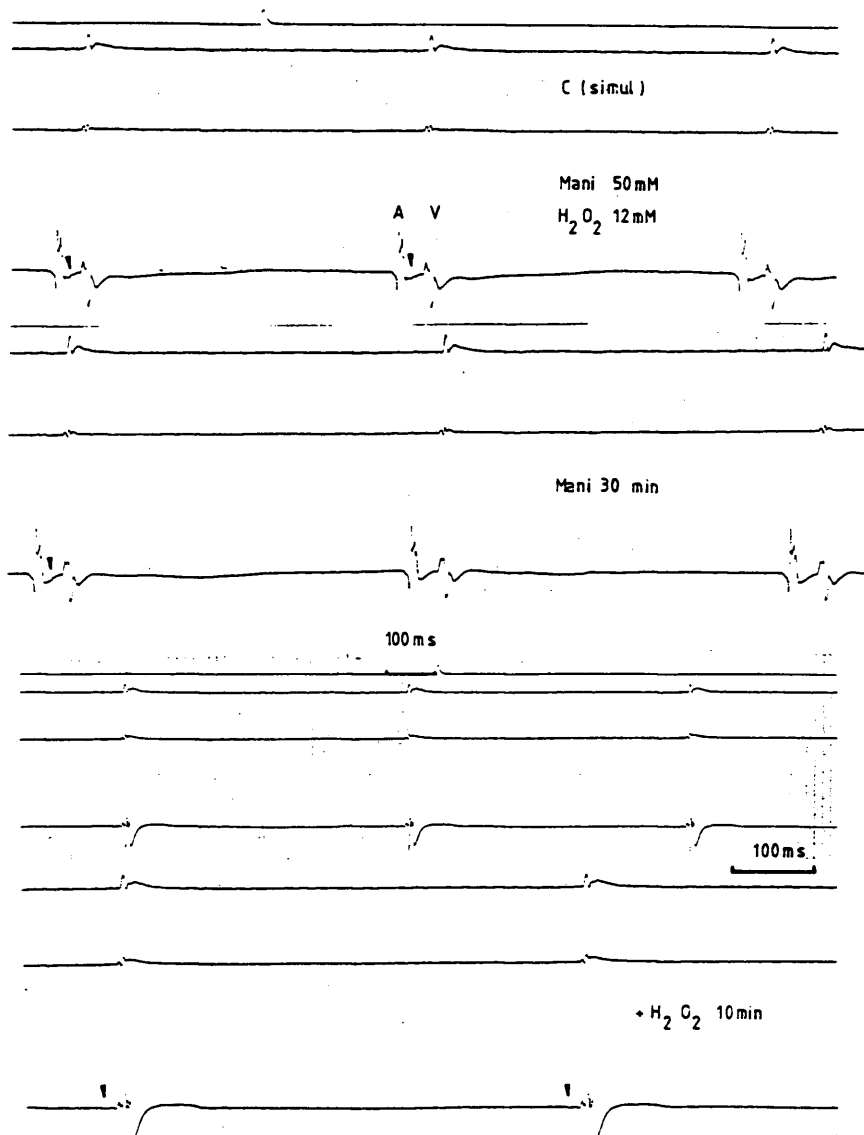
La incidencia de ectopia ventricular, incluidos ritmos bigeminados, fue equiparable (75%, n=4) ns, a los resultados obtenidos con la serie de Manitol 50 mM más H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente; y también con lo observado usando H_2O_2 12 mM aisladamente. La proporción de TV ((sin episodios de RIVA) fue del 75%, dato significativo ($p < 0,035$) frente a la serie de Manitol 50 mM más H_2O_2 12 mM antes mencionada que sí presentó una alta incidencia de RIVA (75%, n=4). Fibrilaron todas las preparaciones (100%)(Fig. 17-3a')(Tabla 2) a los $10,75 \pm 1,101$ min

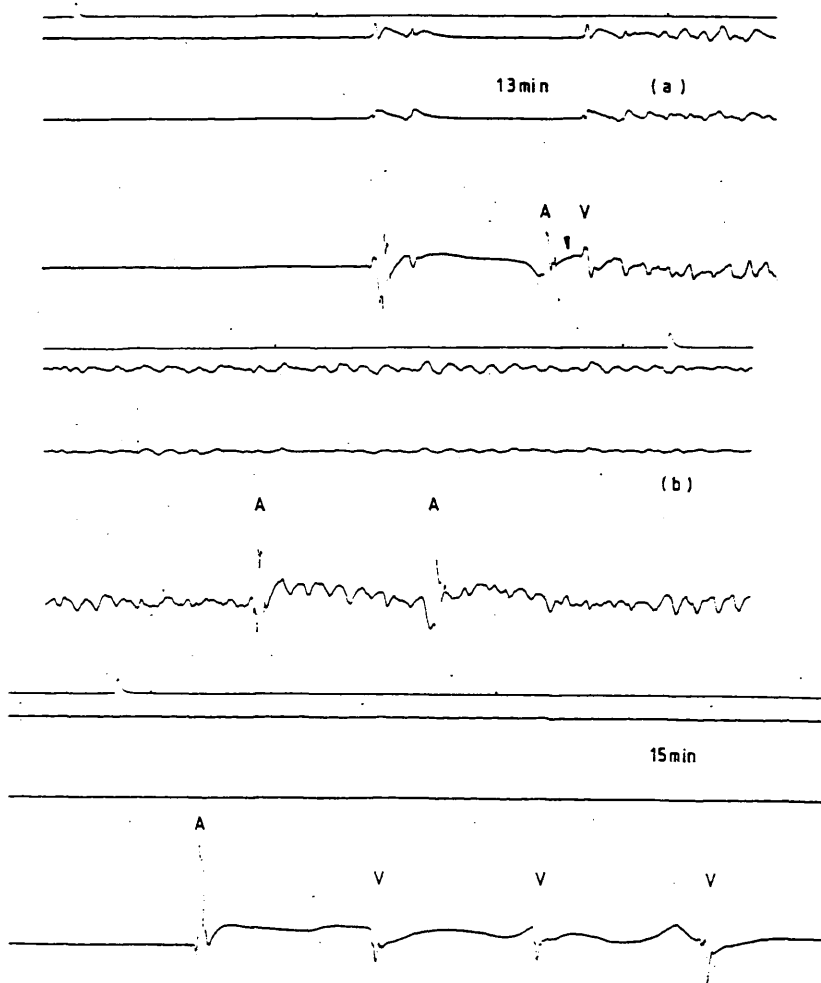
de perfusión, significativamente más precoz que DMSO 10^{-2} M y H_2O_2 12 mM simultáneamente ($P < 0,012$); también significativo respecto a Manitol 50 mM más H_2O_2 12 mM de la serie anterior (Tabla 3). La FV fue irreversible en el 75% (Fig. 8-f) recuperándose un 25% en el plazo de 3 minutos, pero acompañado de bloqueo nodal 3:1 progresando a 5:1 en escasamente 1 minuto. Siguió RA con bloqueo nodal completo y marcada corriente de lesión auricular hasta los 50 minutos que se mantuvo la observación (Fig. 17-3a'). La Fig. 26 es una muestra de las variadas disritmias observadas en esta serie de experimentos con Manitol 50 mM perfundido ininterrumpidamente más H_2O_2 12 mM.

Se contabilizó un 75% ($n=4$) de RA con bloqueo nodal completo y una incidencia similar de DAV, $p < 0,035$ en ambos casos, respecto a DMSO 10^{-3} M perfundido ininterrumpidamente más H_2O_2 12 mM. Se mantuvo también la elevada proporción de Ia con morfología en tienda de campaña sugerente de lesión auricular, 100% ($p < 0,012$) comparado con ambos protocolos de DMSO, 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM. No se vió ninguna alteración de la onda T. El segmento AV presentó supradesnivelamiento en un 25% ($n=4$). En igual proporción quedaron afectados los complejos QRS con reducción de su voltaje en un 70% y ensanchamiento de la señal eléctrica, abarcando también los electrogramas auricular y ventricular (proporciones parecidas con H_2O_2 12 mM aisladamente). No hubo indicios de PT.

Con lo dicho, queda evidente que el Manitol no alcanzó el nivel de protección ofrecida por el DMSO frente a H_2O_2 , a ninguna de las concentraciones estudiadas, y en ninguno de los protocolos de perfusión

184





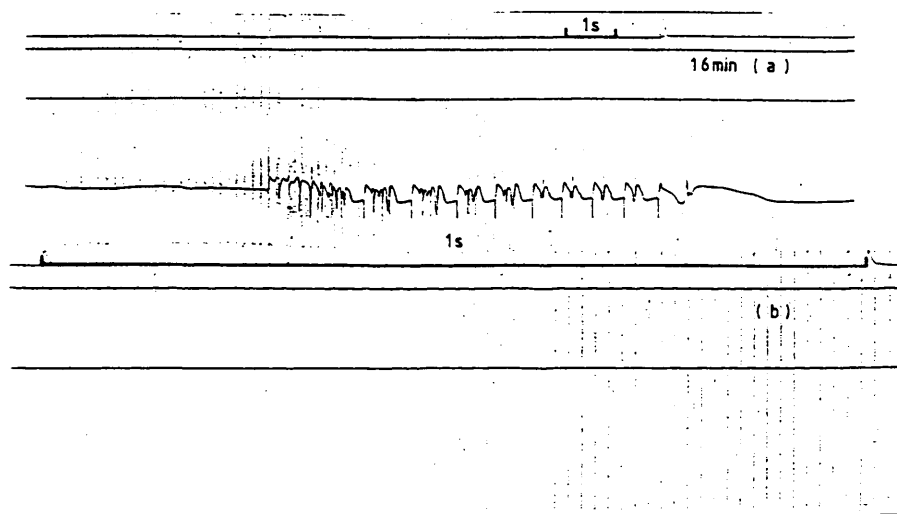


Fig.26. Estas secuencias electrocardiográficas corroboran la ausencia de protección con Manitol 50 mM frente a los efectos deletéreos de H_2O_2 12 mM; ambas sustancias perfundidas simultáneamente. El Manitol actúa en una fase previa durante 30 minutos, aisladamente. A los 10 minutos de añadir H_2O_2 al Manitol, se establece BSA completo con escape Hisiano (las dos secuencias representan el mismo fenómeno, registrado a 250 mm/s, más ampliado en la tira al final de página). Se puede apreciar el inicio de FV a los 13 minutos (trazo continuo a y b). A partir de los 15 minutos, se sucedieron varios episodios breves de asistolia (30 segundos de duración) intercalándose salvas de TV no sostenida, precedidas siempre por un latido auricular. Esta actividad repetitiva cambió a TV sostenida a los 16 minutos, estableciéndose bruscamente asistolia terminal (trazo continuo a y b, a 25 y 250 mm/s respectivamente) mantenida hasta los 60 minutos de observación. (Símbolos con igual significado que Figs. anteriores).

adoptados.

El DMSO por su parte, aún bloqueando la aparición de FV mostró dos comportamientos bien diferenciados frente a H_2O_2 12 mM; según se haya mantenido en circuito durante todo el experimento, o retirado antes de añadir H_2O_2 . Estas observaciones serán objeto de más amplia discusión más adelante.

Arritmias en la serie de glucosa y H_2O_2

Siendo la glucosa sustrato fundamental, fuente de energía en los procesos metabólicos de las células eucariotas, se diseñó una serie complementaria con esta sustancia perfundida ininterrumpidamente junto con H_2O_2 12 mM. Se escogió la molaridad de 20 mM por razones ya expuestas. En una primera fase se analizaron los efectos de la glucosa aisladamente sobre el miocardio, resultados expuestos en apartados anteriores; añadiendo H_2O_2 en una 2ª fase (según el protocolo de la fig. 5-d) una vez concluidos 30 minutos de perfusión con glucosa 20 mM.

Al añadir H_2O_2 12 mM, se presentaron las primeras arritmias (EV, EA aislados) a los $12,75 \pm 3,037$ min, significativamente más tardío que el H_2O_2 aislado a la misma concentración ($p < 0,025$), y más que Manitol - 50 mM y H_2O_2 12 mM perfundidos simultáneamente (ns) (Tabla 3).

Con una incidencia no superior al 25% ($n=4$) en cada categoría, se dieron las siguientes arritmias supraventriculares: BS, BSA de tipo

2:1, AS, EA, TS, observando una reducción de la BS ($p < 0,055$) en el límite de la significación, y no significativo en los demás trastornos supraventriculares citados, comparado con H_2O_2 12 mM aisladamente.

Se contabilizó un 75% de EV (incluido bigeminismos), también un 75% (n=4) de TV (ns), respecto a H_2O_2 12 mM aislado, adoptando un 50% la morfología de RIVA.

De interés es destacar que no fibrilaron ninguno de los corazones a los 30 minutos de haber añadido H_2O_2 12 mM significativo comparado con H_2O_2 12 mM aisladamente ($p < 0,012$) y también frente a Manitol más H_2O_2 independientemente de los protocolos y concentraciones consideradas ($p < 0,035$). (Tabla 2). (Fig. 8g y 18-2a'). Este es el tiempo límite, en el protocolo estudiado, para determinar la capacidad de protección de la glucosa. Pero se siguió la observación hasta los 60 minutos, y tampoco se presentó fv ni FV destacando la presentación de trastornos de la conducción y reducción paulatina del voltaje de los electrogramas pasados los treinta minutos. Insistimos en el hecho que se mantuvo el RS y conducción AV en el 100% de los casos (n=4) durante la perfusión que se mantuvo un total de 110 minutos. (Fig. 18-2a').

Se registró un 50% (n=4) de bloqueo AV de 2º grado: un 25% de tipo Wenckebach y otro 25% con patrón 2:1. Sobresale la incidencia nula de BAV de 3º grado y RA, significativo respecto a Manitol 5 mM y 50 mM más H_2O_2 12 mM independientemente del protocolo analizado. ($p < 0,035$) (Tabla 2).

Los electrogramas presentaron los cambios comunes vistos hasta ahora: ensanchamiento con reducción de voltaje de la onda T en el 50% (ns) de las preparaciones (n=4), supradesnivelamiento del segmento AV en otro 50% (ns), disminución del voltaje de QRS del 40% en un 50% de los experimentos (n=4) (ns). Igualmente, cambiaron de morfología los auriculogramas y ventriculogramas en el 50% en ambos casos - (ns). En este grupo no se originaron PT ni cambios en la Ta sugerente de lesión auricular. No hubo significación respecto a H_2O_2 12 mM aisladamente. (Tabla 2).

Estos resultados confirman la propiedad protectora de la glucosa contra la FV en los corazones aislados expuestos a H_2O_2 12 mM, además de reducir drásticamente la incidencia general de disritmias y retrasar significativamente su tiempo de presentación como bien se recordará, a mismo título que el DMSO y a diferencia de la escasa o nula protección ofrecida por el Manitol. Van der Heyden G (160) de los Laboratorios de Carmeliet ha obtenido resultados similares en fibras miocárdicas aisladas de cobaya demostrando el efecto protector de la glucosa 20 mM frente al CN (inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial).

Observemos que se ha ido perfilando un cierto paralelismo entre la aparición de FV y alargamiento del intervalo AH en los protocolos presentando dicha arritmia. La Fig. 27 muestra en abscisas los diferentes grupos de corazones estudiados (indicando las concentraciones de las sustancias utilizadas) y que en algún momento fibrilaron con incremento significativo de AH ($p < 0,001$) respecto al control. En ordenadas concuerdan

VARIACIONES INTERVALO AH versus FVi o no FV

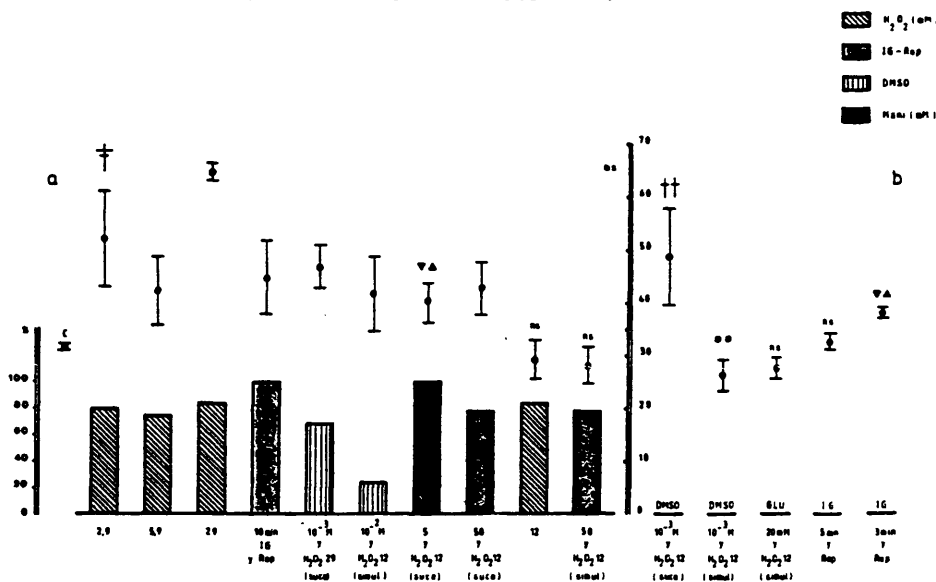


Fig.27. Gráfica de barras relacionando el comportamiento del intervalo AH - y el desencadenamiento de FVi(a) lado izquierdo del diagrama; y ausencia de FV (b) lado derecho de la figura. En abscisas figura la concentración de las diferentes sustancias utilizadas, así como los protocolos de trabajo. En ordenadas (lado izquierdo) se representan los porcentajes de casos presentando FV, y en el eje de ordenadas del lado derecho se leen las modificaciones del intervalo AH en milisegundos (ms), representadas con el error estándar(\pm SEM). (\dagger p < 0,001; $\dagger\dagger$ p < 0,005; triángulos, p < 0,015; ** p < 0,025; ns, no significativo). Más información en el texto.

los porcentajes de incidencia de FV; así como la no aparición de dicha arritmia. También se representan en abscisas los grupos de experimentos que no presentaron FV pero con comportamiento no uniforme del intervalo AH. A cada barra le corresponde también en ordenadas la variación sufrida por el intervalo AH al concluir cada grupo de experimentos; valores expresados en ms \pm SEM con la significación estadística de AH respecto al control.

Con H_2O_2 2,9 mM la proporción fue del 80% (n=5), siendo del 75% (n=4) con 5,9 mM y 83,33% (n=6) con 29 mM. Para la isquemia global de 10 minutos seguido de reperfusión (n=4) la incidencia fue contundentemente del 100%. Con DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 29 mM perfundidos sucesivamente (n=7), la incidencia fue del 71,42 %. Con H_2O_2 12 mM más DMSO 10^{-2} M perfundidos conjuntamente se dió una incidencia de solo un 25% (n=4). Con Manitol 5 mM más H_2O_2 12 mM añadidos al sistema de perfusión sucesivamente se dió el 100% (n=4) de FVi. Con Manitol 50 mM más H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente, observamos un 75% (n=4) de irreversibilidad. H_2O_2 12 mM aisladamente y Manitol 50 mM perfundido sin interrupción con H_2O_2 12 mM mostraron una incidencia de FVi del 83,33% (n=6) y 75% (n=4) respectivamente, pero con acortamiento del intervalo AH, aunque no significativo.

Analizando la segunda parte del diagrama (Fig. 27-b) englobando los grupos con incidencia nula de FVi se observa el alargamiento significativo de AH con DMSO 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM perfundidos sucesivamente ($p < 0,001$). Las siguientes series muestran más bien acortamiento de

AH, significativo ($p < 0,025$) respecto al control, en el caso de DMSO - 10^{-3} M más H_2O_2 12 mM perfundidos conjuntamente; y no significativo con Glucosa 20 mM y H_2O_2 12 mM perfundidos simultáneamente. Mientras el espacio AH se alarga con la reperfusión precedida de cinco minutos (ns) y tres minutos ($p < 0,015$) de IG, en ausencia de FV. Esta clara discrepancia en el comportamiento del intervalo AH respecto a la presencia o ausencia de FVi demuestra que la aparente relación entre ambos fenómenos es más bien circunstancial.

Finalmente, La Fig. 27 considerada globalmente resalta una vez más - la ineficacia del Manitol frente a la FV provocada por H_2O_2 y la protección ofrecida por el DMSO y la Glucosa.

DISCUSION

A lo largo de este trabajo, se demostró que H_2O_2 perfundido aisladamente, produce arritmias precoces severas e incesantes (supraventriculares y ventriculares) en la totalidad del efectivo estudiado, desencadenándose FV irreversible en cerca del 85% de los corazones independientemente de la molaridad analizada. Por otra parte el 100% de los corazones acabó en RA sin evidencia de actividad eléctrica ventricular (tanto a nivel del ECG periférico como del registro intracavitario). Demostramos una clara relación exponencial entre el tiempo de presentación de FV irreversible y las diferentes concentraciones utilizadas, alargándose éste conforme se reducen éstas últimas. También es llamativa la incidencia de infarto auricular siguiendo criterios clínicos universalmente aceptados (166) y corriente de lesión a nivel nodal y perinodal, amén de los trastornos de la conducción y automatismo. Este patrón de RA terminal nos recuerda unas observaciones de Vassalle y Cols. (139) hechas en el perro anestesiado con posterior infusión de K^+ (solución isotónica). Interesantemente, describió los cambios electrofisiológicos que tuvimos la ocasión de observar con H_2O_2 : ensanchamiento progresivo de los electrogramas auricular y ventricular (también manifiesto a nivel del ECG periférico), bloqueo AV con alargamiento del intervalo AH ($p < 0,001$ en muestra casuística) DAV y DIV y depresión de la conducción ventricular que concluyeron afecta la unión Purkinje-musculatura de trabajo. Resaltamos este último dato que compartimos plenamente, teniendo documentado el alargamiento significativo del intervalo QV ($p < 0,025$ y $p < 0,015$) con H_2O_2 2,9 mM y 5,9 mM respectivamente (Fig. 9 a y b). Apuntaban

también como responsable de estos cambios la heterogeneidad entre los procesos de despolarización y repolarización.

Paralelamente hemos comprobado efectos equiparables con la isquemia — global de diez minutos seguida de reperfusión, presentándose FV irreversible (el 100%) en un lapso de 7 minutos, sin diferencia significativa con H_2O_2 a las molaridades superiores de 12 mM y 29 mM. Hay argumentos sólidos que interrelacionan los efectos de H_2O_2 aisladamente con las circunstancias de la isquemia/reperfusión.

En un principio, ha quedado determinado un "periodo crítico" de isquemia, condición "sine qua non" para observar las arritmias ventriculares precoces degenerando a FVi en el 100% de los casos. Es de 10 minutos en la casuística de este trabajo, siendo de 15 minutos en la de Manning y Hearse — (85). Lo que sí conviene recalcar, son diferencias según las especies y técnicas siendo el tiempo medio de 10 minutos en la rata. Además la mayoría de autores utilizan isquemia regional por ligadura de la arteria coronaria izquierda o su rama descendente anterior (DA) (22,57,60,66,68,71,75,77,82). — Parece haber consenso en lo que respecta al "tiempo crítico" de isquemia (75, 85,86,167,168), ya vislumbrado y subrayado por Tennant y Wiggers (88).

Interesantemente, nuestros hallazgos concuerdan con Manning y Hearse, en cuanto a la nula incidencia y significativa de arritmias ventriculares incesantes y/o fv/FV con periodos cortos de isquemia (3 y 5 minutos) antes de restablecer la perfusión (65). Un dato de interés es

la reducción de las arritmias de forma gradual una vez pasados los 15 minutos - de isquemia regional (visto en corazón aislado de rata) hecho que se sugiere está relacionado con el grado de irreversibilidad de las lesiones isquémicas. En el supuesto de ser muy severas, no hay arritmias con la reperfusión(85). Personalmente, no se pudo comprobar este hallazgo por no responder a la finalidad de las investigaciones llevadas a cabo. Corr y Witkowsky (86) nos presentan datos dispares en el hombre, a raíz de recopilar resultados de estudios multicéntricos. Pero reconocen que las informaciones aportadas son incompletas por no considerar las circunstancias individuales de cada paciente. A pesar de ello, a partir de sus experimentos en corazón aislado de gato, subrayan la importancia del tiempo previo de isquemia, habiendo además demostrado un incremento de la actividad alfa adrenérgica como uno de los elementos fundamentales en los disturbios electrofisiológicos y arritmias de la reperfusión.

Hemos podido comprobar por otra parte la precocidad de estas arritmias de la reperfusión, concordante con otros investigadores (75,85,118,151,169, 170) usando más bien isquemia regional tanto en la rata, cobaya o perro (corazón aislado o animal anestesiado y corazón "in situ").

En cuanto a los efectos de H_2O_2 , se pudo documentar arritmias severas y FV irreversible en un promedio de 85% del efectivo estudiado, y a todas las molaridades con una similitud sobresaliente en la precocidad de presentación (sobre todo a las molaridades altas 12 mM y 29 mM)

con la reperfusión precedida de 10 minutos de isquemia global. Recordemos la ausencia total y significativa de FV en los tiempos de isquemia global analizados en este trabajo (10-5-3 minutos) respecto al 100% de incidencia durante la reperfusión, solamente en el protocolo precedido de 10 minutos de isquemia (Fig. 13). De igual manera quedó determinada una relación entre la duración de la isquemia y la aparición de FV irreversible con la reperfusión. Se ha demostrado una relación clara dosis-respuestas en el caso de H_2O_2 con muy buena correlación (Fig. 7). Estudios de esta índole escasean en la literatura en opinión de Manning y cols. (85). De nuestros resultados resalta que H_2O_2 12 mM marca el límite a partir del cual sus efectos nocivos se superponen de manera tajante a los de la reperfusión precedido de 10 minutos de isquemia global, desencadenándose FV irreversible en un promedio de 10 minutos; similar a la molaridad superior de 29 mM y algo más tardíamente con 5,9 mM y 2,9 mM.

En análisis realizado hasta ahora objetiva una estrecha relación entre las acciones de H_2O_2 y los disturbios que acompañan a la Isquemia/reperfusión. Nos permite entonces especular que en esta última circunstancia se liberan sustancias afines a H_2O_2 (si no, esta misma sustancia) ateniéndonos a resultados concretos de la literatura (7,18,26,57,58,60,66,75,76,78,79,133). Queda entonces totalmente validado el hecho de utilizar directamente diferentes molaridades de H_2O_2 para analizar las arritmias observadas en el modelo de Isquemia/Reperfusión. Adelantamos ya que en los laboratorios de Carmeliet, Van Gool (156) utilizó H_2O_2 en miocito aislado del ventrículo de cobaya. No tenemos noticia bibliográfica

del uso de esta sustancia en corazón aislado de rata perfundido parabio-
ticamente.

Puesto que el H_2O_2 puede originar el radical libre hidroxilo (OH^\bullet), reconocido por su elevada toxicidad, a través de las reacciones de Haber-Weis y Fenton (5,6,7,16,26,133,171), se puede admitir que estamos produciendo esta especie activada citotóxica al añadir H_2O_2 a nuestras preparaciones vía de las citadas reacciones que pueden catalizarse con cantidades infinitesimales de metal, concretamente el hierro miocárdico de los corazones aislados (7).

Más bien otros investigadores utilizan medios variados para producir radicales libres: $FeCl_3$. ADP(75), Hipoxantina + xantinaoxidasa (22), xantina + xantinaoxidasa + EDTA Fe^{3+} (6), xantinaoxidasa + purina (172) demostrando directamente el poder arritmogénico de estos derivados activados del oxígeno.

Se barajan múltiples factores tanto metabólicos como electrofisiológicos para dilucidar la patogenia de las arritmias por reperfusión. Habiendo establecido ya la íntima concatenación de esta circunstancia con la producción de H_2O_2 , analizaremos conjuntamente los posibles mecanismos íntimos involucrados en las disritmias observadas, y de manera particular su máximo exponente, la FV.

Van Gool y Cols. (156) demostraron ya unos efectos electrofisiológicos, concretos de H_2O_2 en miocito aislado de cobaya, utilizando un

margen de molaridades equiparables a nosotros. Describieron una secuencia trifásica: 1ª Despolarización del potencial de membrana (PM) entre -50 a -40 mV, acompañado a su vez de un acortamiento de la duración del PA (DPA) y "actividad espontánea". 2ª Se produce hiperpolarización de la membrana más allá de los niveles control, con inhibición concomitante del batmotropismo. Aparecieron también a modo de "ondas peristálticas" lentas. La tercera fase y final se caracteriza por el establecimiento de "contractura" irreversible con expulsión inclusive del microelectrodo. Al añadir 3,6 mM de Mn^{2+} , quedó bloqueada la despolarización de la primera fase, pero no observaron ningún cambio en la DPA o de la contractilidad.

Interesantemente, y acorde con nuestros hallazgos, la duración de los efectos dependía de la concentración de H_2O_2 , dilatándose su aparición conforme se reducía la molaridad; no observando cambio alguno por debajo de 2 mM. Achacaron estos hallazgos a una probable sobrecarga celular de Ca^{2+} y deplección de ATP.

Electrofisiológicamente sabido es que el PM parcialmente despolarizado (-50 a -40mV) da lugar a las llamadas respuestas lentas Ca^{2+} dependientes (30,31,90,106,135,173,174,175,176). Mientras algunos opinan que la acumulación de calcio intracelular puede no ser responsable de las lesiones por reperfusión (177,178), la evidencia a favor es mayoritaria como ya vimos (30,31,90,106,135,173,174,175,176,179) dejando además entrever nuevas vías, no sensibles a los antagonistas del Ca^{2+} . En este sentido, Chappell y cols. (131) aportaron la evidencia de que la entrada máxima de Ca^{2+} durante la reoxigenación tiene lugar

a través de otros mecanismos independientes de los canales lentos. Al respecto se señala que en la isquemia y acidosis, el acúmulo de Ca^{2+} se debe a vaciamiento de los depósitos del retículo endoplasmático (REn) (30); proceso que puede bloquearse por la Rianodina y Cafeína como han comprobado Sutko (180), Hayashi y col. (135) y Thandroyen en el presente año 1988 (170). Se habla también de ruptura del sarcolema que permite mayor aflujo de calcio al citosol (181).

Aún más se subraya la influencia directa de los receptores simpáticos incrementando su nivel de operatividad durante la isquemia o el infarto de miocardio (182). Se relaciona directamente la entrada masiva de calcio en el modelo de isquemia-reperfusión con una sobreactividad alfa adrenérgica durante la perfusión, demostrado por Sharma y cols. (183) mediante su inhibición con fentolamina o prazosina; lo que -- además selectivamente apunta hacia receptores tipo alfa-1. Corr y cols. (86) admiten la misma relación, habiendo demostrado además incremento de la población de receptores alfa-1 adrenérgicos produciendo isquemia regional en el gato.

Algunos autores han podido comprobar liberación local de Norepinefrina (NE) durante la perfusión (82,167,181,184). Zipes (185) señala que los canales del calcio involucrados se bloquean selectivamente por la acidosis (condición inherente a la isquemia) lo que apoya la antes mencionada observación de influjo de calcio por vías independientes de los canales lentos. Goldberg y cols. (87), Carbonin y col. (151) nos sugieren ya relacionar la exaltación de la actividad alfa adrenérgica/



entrada masiva de calcio y arritmias por reperfusión; y por analogía propondríamos las arritmias inducidas por H_2O_2 . De hecho un posible mecanismo de acción de esta sustancia es el desacoplamiento eléctrico intercelular por aumento de la resistencia longitudinal (R_i), debido a bloqueo de la permeabilidad de los nexus, condicionado por sobrecarga de calcio citosólico. Sabido es que el ATP es esencial para el mantenimiento de una baja concentración de calcio intracelular, y se está asociando la isquemia y condiciones afines con un incremento del AMP_c que iría paralelo al mencionado almacenamiento del catión. El bloqueo de la transmisión eléctrica a nivel de los "tight junctions" reduce la velocidad de conducción favoreciendo la arritmogénesis. (130,174,185, 186).

Otro determinante a considerar es el papel desempeñado por el K^+ . Hay consenso respecto al incremento de esta catión en el medio extracelular durante la isquemia (86,96,106,116, 118,119,139,187,188). Durante la isquemia el K^+_o aumenta pudiendo alcanzar los 28 mM en el centro de la zona afectada en escasos segundos (86). Resulta de ello unas respuestas electrofisiológicas concretas: disminución del potencial de membrana hasta -50 mV, reducción de la velocidad de ascenso del PA (dv/dt o V_{max}) así como de la DPA y del periodo refractario (PR). Vassalle (139) afirma que la red de Purkinje es particularmente sensible a las concentraciones elevadas de K^+_o . Aparece trastornos severos de la conducción con bloqueo a nivel de la unión Purkinje-musculo, opinión también compartida (96,187,188). Este bloqueo por ser unidireccional, puede facilitar arritmias por reentrada (187) inclusive

microreentradas, en el "border zone" limitando el área dañada, por la inhomogeneidad que sigue al periodo isquémico (189). De hecho tenemos documentado aumento significativo del intervalo QV con H_2O_2 perfundido aisladamente (Fig. 9a y b), así como del intervalo AH (Fig. 9a,b,d). Además encontramos la misma serie de disritmias descritas por Vassalle: DAV, DIV, RA. Explica este último fenómeno por la diferente sensibilidad auricular y ventricular frente al potasio extracelular, con lo cual el automatismo ventricular queda totalmente anulado. Janse (96) más recientemente aporta una prueba contundente destruyendo el endocardio y la red de Purkinje mediante aplicación de fenol. Observó que al provocar isquemia, obtiene taquicardia ventricular por reentrada (demostrado con cartografía) pero jamás FV, sino un ritmo ectópico lento y regular. Estos hallazgos nos hace postular que el H_2O_2 destruye la red de Purkinje, y podría explicar la aparición directa de RA o parada en el pequeño porcentaje de corazones que no fibrilaron con H_2O_2 (visto en Fig. 8a). También se señala que los lisofosfoglicéridos bloquean el sistema Na^+/K^+ ATPasa, facilitando así el incremento de K^+ (86). La peroxidación de los lípidos con incremento de los lisofosfátidos puede ser otra vía de actuación del H_2O_2 . Durante el año en curso, Cook (119) propone un nuevo planteamiento: partiendo de unas observaciones hechas en el páncreas endocrino por Noma y cols. y otros investigadores (citado por Cook): canales de K^+ ATP-dependientes (cerrados en condiciones fisiológicas). Durante la isquemia y degradación metabólica del ATP, se abren estos canales facilitando la fuga del catión al medio extracelular, y añade que probablemente por la inhomogeneidad tisular creada, puede dar lugar a la FV que se ve en el infarto de miocardio.

Durante la reperfusión, decae rápidamente el K^+ (86,118), pero aquí la relación con el desencadenamiento de FV no está establecida. Lubbe y cols. (118) perfundiendo con Tyrode bajo en K^+ (3 mM) obtuvo FV durante la reperfusión en el 100% de los corazones aislados de rata, igual que nosotros. Este hecho queda corroborado con los experimentos de Corr (86), reduciendo la incidencia de las arritmias por reperfusión, al utilizar medio enriquecido en K^+ .

Finalmente, el H_2O_2 puede actuar vía de las reacciones de radicales libres de oxígeno, originando el radical neutro hidroxilo (OH^\bullet) reconocido como el más tóxico (5,6,9,16,18,23,26).

Un primer aspecto a analizar es el lugar de generación de estos metabolitos tóxicos del oxígeno. Está comprobado que se pueden originar extracelularmente a través de la reacción de la xantina-oxidasa del endotelio vascular o intracelularmente vía de la llamada "fuga univalente" de radical $O_2^{\bullet -}$ por reducción de los coenzimas de la cadena respiratoria mitocondrial: NAD, FAD, Coenzima Q(171). Tiene particular influencia la concentración de catalizadores metálicos (Fe, Cu, Zn), en ambos espacios. Además se insiste en el hecho que cantidades infinitesimales de metal son suficientes para originar OH^\bullet vía de la reacción de Fenton a partir del H_2O_2 (6,7,171).

El H_2O_2 es una molécula neutra de pequeño tamaño, y que atraviesa las membranas biológicas con igual facilidad que el agua (6). Desde el medio extracelular, puede provocar la degradación del ácido hialurónico

iniciando ya daños estructurales (171), cuanto más fácil por la pobreza en mecanismos defensivos contra las especies activadas del oxígeno y moléculas afines; a diferencia del medio intracelular, rico en barreres naturales, donde la generación del radical neutro OH^\cdot es excepcional, presentándose solo en situaciones patológicas como la isquemia, acidosis (171) en las cuales las defensas naturales se ven desbordadas.

A pesar de la vida media corta del radical OH^\cdot , su toxicidad se ve favorecida por la formación de intermediarios como el radical anión carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) así como la peroxidación de los AGLP de la membrana celular, con la ruptura simultánea de la pared de los liposomas. De estas reacciones se originan los radicales peróxidos lipídicos (ROO^\cdot) y los hidroperóxidos lipídicos (ROOH), llegando a la formación de malondialdehído (MDA) como producto final de la peroxidación lipídica (24,39,40,70,81,171). Con estas reacciones en cadena, queda alterada la integridad celular y permeabilidad vascular, con lo que los productos derivados invaden al medio extracelular. También se activan las fosfolipasas (A_1 , A_2 , C y D) que ponen en marcha el metabolismo del ácido araquidónico, vía de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa originándose las prostaglandinas G_2 y H_2 y leucotrienos respectivamente (16,26,39,40).

Según del Maestro (171), durante la isquemia las células adoptan el metabolismo anaeróbico con predominio de la glucogenólisis, opinión también compartida por Dennis (190). Pero con la reperusión, se encuentran en una situación parecida a las células anaerobias primigenias, con lo cual la citotoxicidad del O_2 molecular se desarrolla al máximo, (171), en cuya cadena de reacciones desencadenadas por su reducción

se llega a la formación de H_2O_2 . Podemos entonces deducir de este hecho que remedamos directamente la fase de reperfusión al añadir H_2O_2 a las preparaciones de corazón aislado. En el citosol, por efecto de la catalasa de los peroxisomas y glutatión peroxidasa, se reduce el H_2O_2 hasta H_2O y O_2 molecular (6). Pero Weiss (6) nos recuerda que el corazón contiene 150 veces menos catalasa, 4 veces menos SOD, 5 veces menos glutatión que el hígado; lo que pone en evidencia la peculiar sensibilidad del miocardio al daño potencial producido por radicales oxigenados activados. Además está comprobado que se pueden desencadenar reacciones de radicales libres derivados del O_2 en presencia de concentraciones tisulares ínfimas de este elemento (1 mmHg) durante la isquemia (184), sensibilizando al miocardio que entonces sufre lesiones más severas con la reperfusión (26) amén de arritmias letales (151,169,191,192,193,194,195,196). El análisis de nuestros resultados nos permite compartir la opinión de Braunwald en el sentido de ser la reperfusión miocárdica un "arma de doble filo" (197).

Un dato de interés, es la demostración por Chriske (198) de una diferencia significativa en contenido de enzimas glicolíticas y oxidativas en el miocardio de ambos ventrículos, con predominio en el izquierdo (muy demostrativo en la isquemia aguda). Se puede explicar por la mayor masa ventricular izquierda, y a la vez es compatible con el patrón peculiar de DIV que encontramos cuando se presenta FV por efecto del H_2O_2 o durante la reperfusión precedida de diez minutos de isquemia global.

Adoptamos la postura de comprobar la efectividad de diversos compuestos: barredores de radicales libres y regeneradores metabólicos, en evitar las disritmias precoces de la reperfusión y sobre todo prevenir la presentación de FV. Este enfoque constituye una diferencia básica respecto a otras líneas de investigación que hablan más bien en términos de reducir la incidencia de dichas arritmias y de la FV (71,75,167,170,172,199).

El DMSO demostró poder prevenir la presentación de FV en el 100% de las preparaciones a la molaridad de 10^{-3} M, perfundido durante 30 minutos antes de añadir H_2O_2 como bien se recordará. Incluso consiguió forzar la recuperación de RS frente a la molaridad superior de 29 mM, y también significativamente en las series comparativas manteniendo el DMSO en el circuito de perfusión ininterrumpidamente. Curiosamente hubo FV, aunque en baja proporción y reversible en el 100% de los casos, cuando se incrementó la concentración del DMSO a 10^{-2} M, pero respetando la molaridad del H_2O_2 a 12 mM.

Puesto que se mantuvo en todo momento la molaridad del H_2O_2 (12 mM), parece más efectivo el DMSO frente a H_2O_2 cuando se perfunden sucesivamente. El DMSO es una sustancia atóxica que atraviesa con facilidad la membrana celular, alcanzando rápidamente el punto de equilibrio entre los medios intra y extracelular en el miocardio de la rata (157,200). En cuanto a los parámetros de permeabilidad, podemos aceptar que la similitud con el H_2O_2 es obvia. Por otra parte, Repine (157) ha validado el uso del DMSO para detectar radicales OH^{\bullet} . Queda pues obvio que el efecto de esta sustancia se explica por su efecto

barredor de radicales OH^\cdot , que se originan a partir del H_2O_2 que añadimos, vía de la reacción de Fenton. Queda así bloqueada la cascada de reacciones dependientes de esta especie activada del O_2 , citotóxica por antonomasia: activación de fosfolipasas por acúmulo de calcio citosólico, génesis de prostaglandinas G_2 y H_2 , leucotrienos, peroxidación de los fosfolípidos de la doble capa con cambios en la estructura del sarcolema y arquitectura de los canales iónicos, hidrólisis del ácido hialurónico con aumento de la permeabilidad a nivel de la microcirculación, separación del glicocálix del sarcolema, manifiesto también como vacuolización a nivel de los discos intercalares (52), pero manteniéndose intactos los "nexus" o "tight junctions" (56) lo que explica el mantenimiento de la conducción eléctrica (26,56,157,159). El DMSO podría actuar también formando sales metálicas estables con el calcio, inhibiendo entonces su acumulación intracelular (199). También queda descartado cualquier efecto osmótico de esta sustancia por el rápido equilibrio transmembrana alcanzado en el miocardio de la rata (199).

Entonces, volviendo a la aparente menor efectividad del DMSO perfundido ininterrumpidamente con H_2O_2 , cabría la siguiente explicación: el DMSO perfundido aisladamente durante 30 minutos alcanzaría su equilibrio en los espacios intra y extracelular, y al añadir a posteriori el H_2O_2 , quedaría bloqueada la reacción de Fenton totalmente. Mientras, cuando se mantiene el DMSO en perfusión ininterrumpidamente con H_2O_2 , ambas sustancias difundirían libremente, alcanzando el punto de equilibrio simultáneamente, y el efecto del H_2O_2 estaría solo parcialmente contrarrestado.

La glucosa 20 mM sobresalió por la protección absoluta ofrecida contra la FV provocada por H_2O_2 12 mM. En un principio, la glucosa es sustrato metabólico para la célula, y quedó establecido como el más idóneo para mantener la DPA durante la hipoxia (106). Contrarresta también el efecto del 2,4 Dinitrofenol (2,4 DNF) desacoplador de la fosforilización oxidativa, y del cianuro (CN) inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial, a la concentración de 11 mM evitando también el acortamiento de la DPA (160).

Son varios los posibles mecanismos del efecto beneficioso de la glucosa. Se acepta que mantiene la DPA mediante producción de ATP durante la glicólisis. Por otra parte, se ha comprobado en la rata que tiene efecto antiaritmico al evitar la pérdida de K^+ por los cardiomiocitos (10). Recordemos también que el ATP es necesario para evitar la sobrecarga celular por calcio que al aumentar la R_i causa trastornos de la conducción (186). Hess (26) nos recuerda que ya hay mucha evidencia acumulada de que la glucosa protege y previene la FV del síndrome de isquemia-reperfusión, incluso cuando la osmolaridad del suero vuelve a límites de la normalidad. Este dato último excluye, o cuanto menos resta importancia a un posible efecto hiperosmolar en nuestros experimentos.

También el citado autor (26) ha demostrado que la glucosa es un potencial barrador de radicales libres, subrayando Cross (23) particularmente el radical OH^{\cdot} , que es el más activo y citotóxico.

Nuestros resultados concuerdan totalmente con los hallazgos de los citados autores, ya que el H_2O_2 que añadimos directamente origina radicales OH^\cdot mediante la reacción de Fenton, incluso en presencia de cantidades infinitesimales del metal catalizador (Fe, Cu o Zn) (6,7,71).

El papel de soporte energético desempeñado por la glucosa durante la reperfusión se corrobora también con la observación de que la FV se presenta en corazones con elevada tasa de glicogenolisis durante el periodo isquémico. En estos casos la administración de glucosa exógena con la reperfusión preservaría el glucógeno almacenado y no hay FV. (190). Bien podría ser otro de los mecanismos de protección en la serie estudiada por nosotros.

Ha quedado evidente a lo largo de este trabajo que el Manitol no protege frente a la FV producida por H_2O_2 , independientemente de las molaridades de estas sustancias y de los protocolos analizados. Además, se ha documentado el poder arritmogénico del Manitol a ambas molaridades utilizadas (5 mM y 50 mM), dato no referido en la literatura. Este último punto se puso de manifiesto analizando independientemente los efectos electrofisiológicos de DMSO, GLUCOSA y MANITOL a diferentes molaridades. Se registraron E V y bigeminismo ventricular con esta última sustancia además de alargamiento significativo del intervalo AH como bien se recordará, a ambas molaridades estudiadas. No se presentaron tales efectos con DMSO y glucosa que tampoco modificaron al intervalo Q T, alargado significativamente con H_2O_2 y Manitol como bien se recordará.

Aquí se plantea una fuerte controversia, puesto que son varios - los autores que presentan al Manitol como barredor del radical hidroxilo OH^{\bullet} (75,76,79,157,159) aunque algunos de los citados investigadores consideran que su eficacia está limitada respecto al DMSO. Ahondando en esta última postura, Repine (157) a raíz de un estudio sobre producción de radical OH^{\bullet} por fagocitos, consideró como barredores específicos a las siguientes sustancias de mayor a menor grado: DMSO > MANITOL > ETANOL > BENZOATO SODICO. En lo que concierne al etanol, Ganz (201) nos recuerda que se consideró efectivo en el tratamiento de la estenocardia. Este efecto, según sus estudios realizados en perros anestesiados puede deberse a disminución de la resistencia vascular coronaria y/o reducción del umbral doloroso.

Otros autores han dudado también de la efectividad del Manitol para proteger frente a las arritmias por reperfusión (106), o contra los efectos de la isquemia en general (133), incluso como barredor de radical OH^{\bullet} (200). Hearse (202) consideró incluso que podían ser deletéreos durante la isquemia en la rata, tanto la Glucosa como el Manitol. Encuentra apoyo en cuanto al Manitol por lo pronto en su falta de efectividad (23,26,106,160,190). Los resultados de esta tesis están en la línea de los últimos trabajos citados; es decir, el Manitol no protege y la Glucosa sí en las arritmias por reperfusión.

Siguiendo a las corrientes de investigación que admiten la efectividad del Manitol, consideran que el probable mecanismo de acción puede ser por barrido de radical OH^{\bullet} o efecto hiperosmolar (78,79). Schaffy col (76)

nos subrayan lo crucial del tiempo de administración de la sustancia; pudiendo actuar dentro o fuera del citosol, según el momento de la infusión. De los cuatro grupos estudiados, valorando la reducción de la zona lesionada por isquemia regional en corazón aislado de gato, observaron efectos óptimos administrando el Manitol al iniciar la reperfusión, no obteniendo efecto beneficiosos si la administración se realiza durante el periodo isquémico, ó 15 minutos después de haber iniciado la reperfusión. Piensan que el efecto hiperosmolar del Manitol ayuda a mantener la integridad celular y el flujo a nivel de la microcirculación solamente cuando se administra al inicio de la reperfusión, con lo cual permanecería en el espacio extracelular.

Estableciendo el paralelismo, esta condición se reúne cuando añadimos H_2O_2 posteriormente a la perfusión con la supuesta sustancia protectora en estudio. El Manitol administrado una vez iniciada la reperfusión, puede reducir el edema celular, pero se revela ya incapaz de recuperar la función ventricular y evitar el daño estructural (78). Los mismos autores señalan también que esta sustancia penetra el citosol durante el periodo isquémico si se inició su perfusión antes de provocar la isquemia. Concluyen que la perfusión continua de Manitol no mejora sus efectos, tal como lo hemos comprobado. Señalan además el efecto inotrópico positivo de este fármaco que, según piensan, estaría relacionado con la regulación del Ca^{+2}_i . Este último dato podría explicarnos el efecto arritmogénico de Manitol en nuestros experimentos, aunque este aspecto no se investigó en particular.

Magovern y cols. (79) aceptan también la idea que el Manitol actúa mejor cuando se añade justo antes de iniciar la reperfusión. Por otra parte sugieren que esta recuperación de la función ventricular izquierda, no debe depender directamente de un efecto hiperosmolar. Piensan que el grupo aldehído del Manitol reacciona con el radical OH^\bullet , resultando un radical libre menos tóxico, derivado de esta sustancia. De todos modos, Werns (203) se pregunta también hasta que punto el Manitol actúa como barredor del radical hidróxilo OH^\bullet .

Es menester señalar que el Manitol es sobre todo efectivo asociado a SOD (76,133) para proteger contra el daño isquémico que condiciona el vaciamiento del calcio del $\text{REn}(30)$ y acúmulo citosólico de este catión. Nos atreveríamos a sugerir que esto demuestra más bien la protección ofrecida por la SOD. De hecho este enzima favorece la reincorporación del calcio al REn a la vez que incrementa la actividad -- Ca^{2+} ATPásica de esta estructura subcelular (133). Finalmente el -- Manitol alargó significativamente el intervalo Q T, que se acepta como valoración aproximativa de la sístole eléctrica ventricular (161), de manera similar a H_2O_2 . Como se quiera equiparar el espacio Q T a la DPA, y especulando que el incremento no sea homogéneo en toda la masa ventricular; tenemos entonces un probable mecanismo para explicar el efecto arritmogénico del Manitol.

DETECCION DE RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXIGENO

Respaldados por el ingenioso método ideado por Repine (157) para la detección del radical hidroxilo OH^\cdot valiéndose del DMSO, y demostrando que a través de las reacciones del radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se origina metano (CH_4) en presencia del metal catalizador, tenemos otro argumento sólido que valida la utilización directa del H_2O_2 en este trabajo.

El interés cada vez creciente ha llevado a la búsqueda de métodos más directos y sofisticados para la detección de estas especies activadas, como la resonancia magnética nuclear (RMN) (16,26,184,203). No disponemos del aparataje mencionado, pero cierto es que se obtiene la evidencia indirecta de la presencia de radicales libres derivados del oxígeno a partir de barredores específicos, técnica usada todavía por la mayoría de autores (18,21,22,23,24,57,60,69,71,74,75,76,77,82-a,82-b,133,157,159,172,199,200,205).

PROTECCION CONTRA LAS ESPECIES ACTIVADAS DEL OXIGENO

De todas las posibles fuentes de origen de especies activadas del oxígeno, los neutrófilos están en evidencia, habiendo observado Engler (58) acumulación de polimorfonucleares en el espacio intravascular de tejido miocárdico reperfundido. La formación de factores quimiotácticos, como consecuencia de la activación de la ciclooxigenasa o xantina-oxidasa, favorece esta acumulación de fagocitos en las zonas isquémicas

reperfundidas (203). En esta línea de ideas, se recurre a la deplección de polimorfonucleares mediante sueros antineutrófilos (60), acción directa contra la producción de radical OH^{\cdot} por los neutrófilos con Dimetiltiliurea (DMTU) (59), ó mediante administración de un derivado perfluorado (Fluosol DA) al inicio de la reperfusión, protegiendo el endotelio vascular y evitando el acúmulo de neutrófilos (204).

Las escenas de la figura 28 nos esquematizan el papel nocivo del ataque por los radicales superóxido, llevando a la formación de O_2 molecular, pero también de H_2O_2 mediante la reacción de dismutación catalizada por la SOD. Esta reacción puede ocurrir espontáneamente, pero la ubicuidad de las SOD las pone en evidencia como mecanismo defensor. El H_2O_2 originado es parte integrante de los metabolitos tóxicos derivados del O_2 , sin ser un radical libre en "sensu estricto" (5,6). El organismo dispone de la catalasa de los peroxisomas y la glutatión peroxidasa para transformar este H_2O_2 en H_2O y O_2 molecular (5,21).

Pero estas defensas naturales se ven desbordadas por las condiciones extremas de la isquemia y reperfusión. El interés de los investigadores se enfocó sobre la utilidad de la SOD (Orgoteina), sola o asociada a la Catalasa (5,18,21,22,57,69,74,75,76,77,82-a,82-b, 172,192,203,205). como protección contra los efectos lesivos de la isquemia reperfusión, amén de las arritmias letales. A pesar de tanta evidencia, Uraizee, Reimer y Cols. (206) señalaban en fecha reciente que la SOD no reducía el tamaño de la zona infartada en el modelo de isquemia regional reperfu-

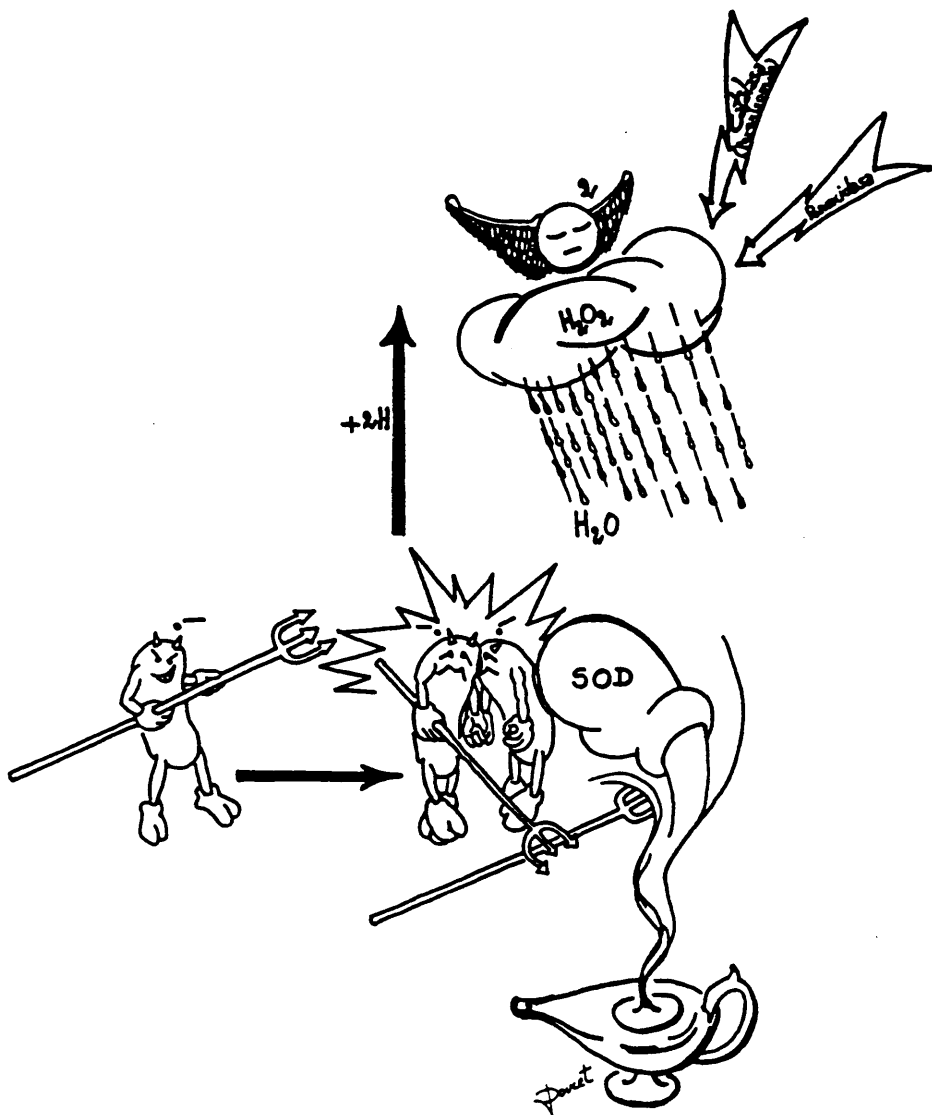


Fig.28. Esta estampa permite tener una representación "animada" del ataque de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los "duendes", y la respuesta - contundente del "omnipresente genio bueno" SOD. (Se amplia la información en el texto)

sión en el perro. Un artículo previo del mismo laboratorio (207) comentaba también la ineficacia del Alopurinol, conocido inhibidor de la xantina-oxidasa (fuente principal de especies activadas del oxígeno en el síndrome de isquemia-reperfusión) (7), en reducir la zona de necrosis en un modelo similar al anteriormente citado. Mientras, otros autores encontraron efectos totalmente beneficiosos tanto en la rata (71) como en el perro (72). La aparente discrepancia viene zanjada por el mero hecho de haber enfocado Reimer y cols. (206,207) sus observaciones en el subendocardio del perro. Bolli y cols. (97) ya habían señalado una disparidad en el comportamiento funcional endoepicárdico en esta especie; de tal forma que el endocardio sufre mayor grado de disfunción durante el periodo isquémico, recuperándose más tardíamente con la reperfusión. Esta misma inhomogeneidad de la recuperación explica las arritmias severas y letales de la reperfusión. Por otra parte aún más recientemente, Hale y Kloner (98) nos subrayan la existencia de un gradiente endo-epicárdico en la especie canina. Presentan una profusa circulación colateral subepicárdica, lo que le confiere mayor resistencia a la isquemia respecto al subendocardio. Como bien sospechaban Reimer y cols., la disparidad de sus resultados se deben a matices de metodología.

De paso diremos que Hale y Kloner (98) han sido los primeros en sistematizar la distribución de la circulación colateral de la rata en el síndrome de isquemia-reperfusión, puntualizando la ausencia de gradiente endo-epicárdico en esta especie y la escasa circulación colateral. En la rata, la isquemia es severa y transmural; aunque

si se inicia la reperfusión en un periodo no superior a los 30 minutos, se recuperan zonas de miocardio medial y subendocárdicas. Esta inhomogeneidad de la recuperación nos explicaría también la FV irreversible de la reperfusión en el contexto de nuestros experimentos.

El interés creciente en la trombolisis intracoronaria y ACTP como vías alternativas a la cirugía de revascularización miocárdica ha llevado ya a ensayos clínicos con la Cu-Zn SOD (192), corroborados con alentadores estudios experimentales (Figs. 82-a y 82-b).

Cook (119) durante el año en curso, nos acaba de presentar un horizonte prometedor relacionado con los canales de K^+ ATP-dependientes, similares a los de las células beta del páncreas. A nivel miocárdico nos dice que bien pueden ser responsables de la fuga de este catión al medio extracelular durante la isquemia (por la degradación del ATP), y secundariamente de la FV que caracteriza al síndrome de isquemia-reperfusión. A la vez nos permite augurar para un futuro no muy lejano, la introducción de bloqueadores de estos canales de K^+ ATP-dependientes como la tolbutamida y glibenclamida en el arsenal terapéutico contra los disturbios del ritmo comunes al síndrome de isquemia-reperfusión.

En este trabajo, se demostró la validez de utilizar directamente el H_2O_2 remediando perfectamente las disritmias precoces del modelo de isquemia-reperfusión, y provocando FV irreversible. Además se ha comprobado la efectividad del DMSO y de la Glucosa contra el radical libre OH^\bullet (el más citotóxico) que deriva de la reducción del H_2O_2 , vía de la ya descrita reacción de Fenton.

El hecho de no utilizar anestesia antes de extirpar el corazón nos - evitó la implicación de factores ajenos con influencia demostrada en la - función miocárdica, siendo todos los anestésicos generales inotrópicos negativos y arritmogénicos (208). Tampoco utilizamos soluciones cardiopléjicas (178,199,200) antes de canular la aorta, y se ha evitado la estimulación eléctrica. Queda entonces reforzada la evidencia de que los disturbios de la conducción y automatismo observados son el efecto directo del H_2O_2 y sus derivados hiperactivos.

En lo que concierne al DMSO, se utiliza como antiinflamatorio en los procesos reumáticos, entre otras aplicaciones clínicas. Por su inocuidad - por vía parenteral (200) bien puede pasar a engrosar la creciente lista de fármacos en uso en la isquemia aguda, papel desempeñado ya clásicamente - por la Glucosa (209) aparte del potencial antiarrítmico de ambas sustancias en el contexto de la perfusión miocárdica.

Finalmente, tenemos que reconocer que los resultados experimentales no se pueden extrapolar sin reserva al contexto clínico. Pero interesante- mente, encontramos similitudes irrefutables (84,86,87) con el modelo anali- zado.

CONCLUSIONES

Analizados los resultados de las investigaciones llevadas a cabo, se deducen las siguientes conclusiones:

- 1.- Ha quedado deslindada una clara relación dosis-respuesta con una buena correlación entre las molaridades usadas de H_2O_2 y el tiempo de aparición de FVi siendo además previsible; ($r = - 0,77$).
- 2.- El H_2O_2 alarga el intervalo AH ($p < 0,001$) respecto al control a todas las concentraciones estudiadas, excepto con 12 mM mostrando tendencia a acortarse. Produce entonces bloqueo suprahisiano de 1º grado.
- 3.- H_2O_2 alarga la LC ($p < 0,025$ a $P < 0,001$) comparado al control a todas las molaridades manifestándose como bradicardia significativa por depresión del automatismo sinusal.
- 4.- H_2O_2 alarga el intervalo AV ($p < 0,001$) frente al control a todas las molaridades, excepto la tendencia a acortarse con 12 mM. Este dato refleja enlentecimiento de la conducción auriculo-ventricular.
- 5.- H_2O_2 alarga el intervalo QT ($p < 0,001$) a las molaridades bajas con tendencia al acortamiento con 12 mM y 29 mM.
- 6.- H_2O_2 alarga el espacio QV ($p < 0,025$ a $0,015$) significando trastornos

de la conducción a nivel de la unión Purkinje musculatura de trabajo ventricular a las molaridades bajas, con tendencia a acortarse con 12 mM y manteniéndose invariable con 29 mM.

- 7.- H_2O_2 produce corriente de lesión auricular.
- 8.- También produce corriente de lesión nodal y zonas perinodales.
- 9.- H_2O_2 condiciona depresión del automatismo, batmotropismo y conducción auricular y ventricular.
- 10.- H_2O_2 remedia los efectos de la reperfusión precedida de 10 minutos de isquemia global.
- 11.- Probablemente, H_2O_2 actúa a través de su derivado activado el radical hidróxilo OH^\cdot .
- 12.- IG de 10 minutos alarga significativamente ($p < 0,001$) los intervalos AH, AV y LC, con bradicardia manifestando depresión del automatismo sinusal. El intervalo QT también se alargó con la IG, significativo ($p < 0,001$) con 5 y 3 minutos de IG.
- 13.- Con la reperfusión precedida de 10 minutos de IG, los parámetros del Hisiograma no se pueden valorar por la aparición precoz de FVi. Mi - entras con 5 y 3 minutos de IG, hay acortamiento brusco de estos parámetros al iniciar la reperfusión (excepto el espacio Q T después -

de 3 minutos de IG) , volviendo a alargarse paulatinamente hasta concluir 60 minutos de reperfusión.

- 14.- No hay fv/FV con 10, 5 y 3 minutos de IG.
- 15.- Hay FVi con la reperfusión precedida de 10 minutos de IG.
- 16.- No se desencadena FV con la reperfusión precedida de 5 y 3 minutos - de IG.
- 17.- Diez minutos de IG es el " período crítico " para desencadenar arritmias severas de la reperfusión y FVi en el corazón aislado de la rata, perfundido parabióticamente.
- 18.- El Manitol alarga significativamente los intervalos AH y QT ($P < 0,001$) a ambas concentraciones analizadas 5 mM y 50 mM, además de los espacios AV y LC (significativo con 50 mM).
- 19.- El Manitol es arritmogénico, desencadenando bigeminismo ventricular a ambas molaridades estudiadas 5 mM y 50 mM.
- 20.- El Manitol produce trastornos de la conducción como bloqueo suprahisiano de 1º grado a ambas molaridades analizadas 5 mM y 50 mM.
- 21.- El Manitol no protege frente a las arritmias y FV provocadas por H_2O_2 independientemente de la molaridad o protocolo considerado.

- 22.- La Glucosa 20 mM perfundida durante 30 minutos produce alargamiento de LC ($p < 0,015$) con tendencia a acortar el intervalo AH. No induce ninguna arritmia ventricular.
- 23.- La Glucosa, potencial barredor de radicales OH^{\cdot} , protege contra las arritmias y fv/FV producidas por $\text{H}_2 \text{O}_2$.
- 24.- El DMSO perfundido aisladamente durante 30 minutos no afecta el espacio AH. Se observa alargamiento de LC ($p < 0,025$) a la molaridad de 10^{-2} M. No produce arritmias ventriculares.
- 25.- El DMSO, reconocido barredor de radicales OH^{\cdot} , protege contra las - arritmias y fv/FV producidas por $\text{H}_2 \text{O}_2$.

BIBLIOGRAFIA

1. Dickerson RE: La evolución química y el origen de la vida. En: Evolución Barcelona. Edit. Labor, 1982, 29-48.
2. Dobzhansky T, Ayala FJ, Stebbins GL, Valentine J: Evolution, San Francisco, WH Freeman, 1978.
3. Roemer AS: Major steps in vertebrate evolution. Science, 1967, 158: 1629
4. Miller SL, Orgel L: The origins of life on earth. Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, 1974, chp. 11-12.
5. Fridovich I: The biology of oxygen radicals. Science 1978, 201: 875-880
6. Weiss SJ: Oxygen, ischemia and inflammation. Acta Physiol. Scand. 1986 (suppl) 548:9-37.
7. Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, Yellon DM: Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion ? Acta Physiol. Scand. 1986 (suppl) 548:65-78.
8. Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol. Scand. 1986 (suppl) 548:87-99.
9. Della Corte E, Stirpe F: Regulation of rat liver xanthine oxidase. Biochem. J 1972, 126:739-745.
10. Cantu RC: Improvement of cerebrovascular perfusion following complete ischemia. (5th European conference on microcirculation, Gottenburg) Bibliotheca Anatomica, 1969, 10:324-327.
11. Granger DN, Höllwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. Acta Physiol. Scand. 1986 (suppl) 548:47-63
12. Ward PA, Johnson KJ, Till GO: Oxygen radicals and microvascular injury to lungs and kidney. Acta Physiol. Scand. 1986 (suppl) 548:79-85.
13. Adkison D, Höllwarth ME, Benoit JN et al: Role of free radicals in ische-

- mia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol. Scand.* 1986 (suppl) 548: 101-107.
14. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB: Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release - *J. Mol. Cell Cardiol.* 1973, 5:395-507.
 15. Martínez Lorenzo A, Couselo Esperón J, González Martínez T y cols. : *Química* . Ed. Bruño, Madrid, 1978, 269-288.
 16. Mason RP, Chignell CF: Free radicals in pharmacology and toxicology- Selected topics. *Pharmacol. Rev.* 1982, 33 (4):189-211.
 17. Mc Cord J: Superoxyde free radicals: biochemistry and pathophysiology -- *Surgery.* 1983, 94:412-414.
 18. Mc Cord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 1985, 312 (3):159-163.
 19. Haber F, Weiss J: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Journal of the Proceedings of the Royal Society.* 1934, A 147:332-351.
 20. Antonini E, Brunori M, Greenwood C, Malmström BG: Catalytic mechanism of Cytochrome Oxidase. *Nature*, 1970, 228:936-937.
 21. Dormandy TL: Free-radical oxidation and antioxidants. *The Lancet*, 1978-- 3-25:647-650.
 22. Ytrehus K, Myklebust R, Mjørs OD: Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc. Res.* 1986, 20:597-603.
 23. Cross CE, Halliwell B, Borisch ET, Pryor WA, Ames BN et al: Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine.* 1987, 107:526-545.
 24. Petkau A: Radiation carcinogenesis from a membrane perspective. *Acta Phy-*

- siol. Scand. 1980, (suppl) 492:81-90.
25. Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* 1982, 107: 397-418.
 26. Hess ML, Manson NH: Molecular oxygen: friend and foe. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1984, 16:969-985.
 27. Mc Cord JM: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by SOD. *Science.* 1974, 185:529-531.
 28. Salin ML, Mc Cord JM: Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 1975, 56: 1319-1323.
 29. Noble DJ: Initiation of the heart beat. Clarendon Press, Oxford, 1979 -- chp.2:29-32.
 30. Sperelakis N: Phosphorylation hypothesis of the myocardial slow channels and control of Ca^{2+} influx. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 123-134.
 31. Coraboeuf E: Electrophysiology of the cardiac cell. In: Bayes A, Cosin J: *Diagnosis and Treatment of Cardiac Arrhythmias*. Pergamon Press, Oxford, 1980, 3-26.
 32. Lössnitzer K, Pfenigsdorf G, Bräuer H: *Miocardio, vasos sanguíneos, calcio*. Ed: Knoll AG, Ludwigshafen, Erasmudruck GmbH, Mainz, 1983, 22.
 33. Beeler GW, Reuter H: The relation between membrane potential, membrane current and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. *J. Physiol.* 1970, 207:211-229.
 34. Morad M, Tung L: Ionic events responsible for the cardiac resting and action potential. *Am. J. Cardiol.* 1982, 49:584-594.

35. Noble D: Ionic basis of rhythmic activity in the heart. In: Zipes DP, Jalife J: Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 3-11.
36. Lüderitz B: Terapia de las alteraciones del ritmo cardíaco. Ed. Reverté, Barcelona, 1982, 3-14.
37. Lucy JA: The fusion of biological membranes. Nature, 1970, 227:815-817.
38. Poole AR, Howell JT, Lucy JA: Lysolecithin and cell fusion. Nature, 1970 227:810-814.
39. Katz AM, Messineo FC: Lipid-membrane interactions and the pathogenesis - of ischemic damage in the myocardium. Circ. Res. 1981, 48:1-16.
40. Ramón JR, Lastra LA, González-Morales MA y cols: La membrana celular. Algo más que una estructura morfológica. Medicine, 1985, 44:1803-1810.
41. Noble D: Initiation of the heart beat. Clarendon Press, Oxford, 1979, 33-42.
42. Noble D: Initiation of the heart beat. Clarendon Press, Oxford, 1979, 1-9.
43. Carmeliet E: Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac - Purkinje fibers. (abstr). J. Physiol. Lond. 1984, 353:125p.
44. Spach MS, Dolber PC: The relation between discontinuous propagation in - anisotropic cardiac muscle and the "vulnerable period" of reentry. In: Zipes DP, Jalife J: Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 241-252.
45. Noble D: Initiation of the heart beat. Clarendon Press, Oxford, 1979, - 132-149 y 156, 158, 160.
46. Giraud G, Puech P, Latour H, Hertault E: Variations de potentiels liés - à l'activité du système auriculoventriculaire chez l'homme (enregistrement électrocardiographique endocavitaire). Arch. Mal. Coeur, 1960 - 53:757

47. Scherlag BJ, Lau SH, Helfant RH et al: Catheter technique for recording - His bundle activity in man. *Circulation*, 1969, 39:13-18.
48. Scherlag BJ, Samet P, Helfant R: His bundle electrogram. *Circulation*, - 1972, 46:601-613.
49. Davies MJ, Anderson RH, Becker AE: The conduction system of the heart. - Butterworths, 1983, 61-64.
50. Zimmerman ANE, Hulsman WC: Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*, 1966 211:646-647.
51. Zimmerman ANE, Daems W, Hulsman WC et al: Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc. Res.* 1967, 1:209-210.
52. Hearse DJ, Humphrey ST, Bullock GR: The oxygen paradox and the calcium - paradox: two facets of the same problem ? *J. Mol. Cell Cardiol.* 1978, 10: 641-668.
53. Feinberg H, Rosenbaum DS, Levitsky S, Silverman NA et al: Platelets deposition after surgically induced myocardial ischaemia. An etiologic factor for reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1982, 84:815-822.
54. Rao PS, Patrick P, Evans RG, Mueller HS: Changes in polyunsaturated fatty acids contents and glutathione peroxidase activity in rat myocardium after acute infarction. *Clinical Research*, 1980, 758-A.
55. Heyndrickx GR, Baig H, Nellens P et al: Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *Am. J. Physiol* 1978 234:H653-H659.
56. Braunwald E, Kloner RA: The stunned myocardium: Prolonged postischemic - ventricular dysfunction. *Circulation*, 1982, 66:1146-1149.

57. Przylenk K, Kloner RA: Superoxide Dismutase plus Catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium". *Circ. Res* 1986, 58(1):148-156.
58. Engler R, Covell JW: Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog. *Circ. Res.* 1987, 61:20-28.
59. Bolli R, Zhu WX, Hartley CJ et al: Attenuation of dysfunction in the post-ischaemic stunned myocardium by dimethylthiourea. *Circulation*, 1987, 76 (2):458-468.
60. Mitsos SE, Askew TE, Fantone JC, Kunkel SL et al: Protective effects of-N-2,mercaptopropionyl glycine against myocardial reperfusion injury after neutrophil depletion in the dog: evidence for the role of intracellular-derived free radicals. *Circulation*, 1986, 73(5):1077-1086.
61. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.* 1986 (suppl) 548:39-46.
62. Lemley JM, Meneely GR: Distribution of tissue fluid in hearts of rats -- subjected to anoxia. *Am. J. Physiol.* 1952, 169:61-65.
63. Kuprianov V: Some morphological evidence of the functional adaptation of the microcirculation. (5th European conference on microcirculation, Gottenburg) *Bibliotheca Anatomica*, 1969, 10:261-272.
64. Acosta D, Wenzel DG: Injury produced by free fatty acids to lysosomes -- and mitochondria in cultured heart muscle and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 1974, (abstr) 20(3):417-426.
65. Hülsman WC, Dubelaar ML: Early damage of vascular endothelium during cardiac ischaemia. *Cardiovasc. Res.* 1987, 21(9):674-677.
66. Sunnergren KP, Rovetto MJ: Myocyte and endothelial injury with ischemia reperfusion in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol.* 1987, 21:H1211-H1217.

67. Tranum-Jensen J, Janse MJ et al: Tissue osmolality, cell swelling, and re-perfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ. Res.* 1981, 49:364-381
68. Frame LH, Antonio López J, Ban AN Khaw, Fallon JT et al: Early membrane damage during coronary reperfusion in dogs. *J. Clin. Invest.* 1983, 72: - 535-544.
69. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1979, 135:372-376
70. Aznar J, Teresa Santos M, Valles J, Sala J: Serum malondialdehyde-like material (MDA-LM) in acute myocardial infarction. *J. Clin. Pathol.* 1983 36:712-715.
71. Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ: Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. *Circ. Res.* 1984, 55(4):545-548.
72. Akizuki S, Yoshida S, Chambers DE, Eddy LJ et al: Infarct size limitation by the xanthine-oxidase inhibitor, Allopurinol, in closed-chest dogs with small infarcts. *Cardiovasc. Res.* 1985, 19:686-692.
73. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery*, 1983, 94:415-422.
74. Horneffer PJ, Gardner TJ: Oxygen free radical scavengers reduce infarct size on reperfusion. (Abstr) *Circulation (suppl II)* 1984, 70:1039.
75. Bernier M, Hearse DJ, Manning AS: Reperfusion-induced arrhythmias and - oxygen-derived free radicals: studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ. Res.* 1986, 58:331-340.
76. Stewart JR, Blackwell WH, Crute SL et al: Inhibition of surgically indu-

- ced ischemia reperfusion injury by oxygen free radical scavengers. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1983, 86:262-272.
77. Otani H, Engelman RM, Ronson JA, Breyer RH et al: Cardiac performance during reperfusion improved by pretreatment with oxygen free-radical scavengers. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1986, 91(2):290-295.
 78. Schaff HV, Goldman RA, Bulkley BH et al: Hyperosmolar reperfusion following ischemic cardiac arrest. Surgery. 1981, 89(2):141-150.
 79. Magovern Jr. GJ, Bolling SF, Casale AS et al: The mechanism of Mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger ? Circulation. 1984, 70(suppl I):91-95.
 80. Rao PS, Rao PB, Brock FE, Mueller HS: Patterns of free radicals across the heart during acute myocardial infarction. Clin. Research. 1980, 28 - (abstr) 758-A.
 81. Misra HP, Weglicki WB, Abdulla R, Mc Cay PB: Identification of a carbon-centered free radical during reperfusion injury in ischemic rat heart. - Circulation. 1984, (abstr) 70(suppl II):260.
 - 82a. Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM, Weisman HF et al: Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: Insights into the pathophysiology of reperfusion injury. Circ. Res. 1986, 74(6): 1424-1433.
 - 82b. Ambrosio G, Myron L, Weisfeld ML et al: Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. Circ. Res. 1987, 75(1):282-291.
 - 83₁. Mangiola S, Ritota MC: Cardiac arrhythmias. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1976, 30-36, 58-62, 93-98, 104, 112, 113.

83. Méndez C: Mechanisms of cardiac arrhythmias. In: Bayes A, Cosin J: *Diagnosis and Treatment of Cardiac Arrhythmias*. Pergamon Press, Oxford, 1980 27-41.
84. Tzivoni D, Keren A, Granot H et al: Ventricular fibrillation caused by myocardial reperfusion in Prinzmetal's angina. *Am. Heart J.* 1983, 105: 323-325.
85. Manning AS, Hearse DJ: Reperfusion induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1984, 16:497-518.
86. Corr PB, Witkowski FX: Potential electrophysiologic mechanisms responsible for dysrhythmias associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation.* 1983, 68(suppl I):16-24.
87. Goldberg S, Greenspan AJ, Urban PL, Muza B et al: Reperfusion arrhythmia: a marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 1983, 105:26-32.
88. Tennant R, Wiggers CJ: The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am. J. Physiol.* 1935, 112:351-361.
89. Downar D, Janse MJ, Durrer D: The effect of acute coronary occlusion on subepicardial transmembrane potential in the intact porcine heart. *Circulation.* 1977, 56:217-224.
90. Russel DC, Wojtczak J, Oliver MF: Combined electrophysiological technique for assessment of the cellular basis of early ventricular arrhythmias. *Lancet.* 1977, 2:686-688.
91. Kaplinsky E, Ogawa S, Michelson E, Dreifus L: Instantaneous and delayed ventricular arrhythmias after reperfusion of acutely ischemic myocardium: evidence for multiple mechanisms. *Circulation.* 1981, 63:333-340.
92. Penkoske PA, Sobel BE, Corr PB: Disparate electrophysiological altera--

- tions accompanying dysrhythmia due to coronary occlusion and reperfusion in the cat. *Circulation*. 1978, 58:1023-1035.
93. Naimi S, Avitall B, Meiszale J, Levine HJ: Dispersion of effective refractory period during abrupt reperfusion of ischaemic myocardium in dogs. *Am. J. Cardiol*. 1977, 39:407-412.
 94. Russel DC: Early ventricular arrhythmias: relationship of electrophysiology to blood flow and metabolism. In: Parrat JR: Early arrhythmias resulting from myocardial ischaemia. London Mc Millan Press, 1982, 37-56.
 95. Janse MJ, Cinca J, Morena H, Fiolet JWT et al: The "border zone" in myocardial ischemia, an electrophysiological, metabolic and histochemical - correlation in the pig heart. *Circ. Res*. 1979, 44:576
 96. Janse MJ, Wilms-Schopman F, Wilensky RJ, Tranum-Jensen J: Role of the -- subendocardium in arrhythmogenesis during acute ischaemia. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 353-362.
 97. Bolli R, Lekich RF, Myers ML et al: Disparity of epicardial and endocardial function during ischemia and reperfusion. (abstr) *Circulation*. 1984, 70(suppl II):260
 98. Hale S, Kloner RA: Effect of early coronary artery reperfusion on infarct development in a model of low collateral flow. *Cardiovasc. Res*. 1987, - 21:668-673.
 99. Sheridan DJ, Penkoske PA, Sobel BE, Corr PB: Alpha adrenergic contribution to dysrhythmias during myocardial ischaemia and reperfusion in cats. *J. Clin. Invest*. 1980, 65:161-171.
 100. Corr PB, Shayman JA, Kramer JB, Kipnis RJ: Increased alpha-adrenergic - receptors in ischemic cat myocardium: a potential mediator of electro-

- physiological derangements. *J. Clin. Invest.* 1981, 67:1232-1236.
101. Crome R, Hearse DJ, Manning AS: Relationship between cellular cyclic AMP content and the incidence of ventricular fibrillation upon reperfusion after varying periods of ischaemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1983, 15: 180 (suppl I) (abstr).
 102. Jennings RB, Reimer KA: Biology of experimental , acute myocardial ischemia and infarction. In : Hearse DJ, de Leiris J. *Enzymes in Cardiology: Diagnosis and Research.* John Wiley & Sons, New-York, 1978, 21-57.
 103. Balke CW, Kaplinsky E, Michelson EL, Naito M, Dreifus LS: Reperfusion - ventricular tachyarrhythmias: correlation with antecedent coronary occlusion tachyarrhythmias and duration of myocardial ischaemia. *Am. Heart J.* 1981, 101:449-456.
 104. Penny WJ, Sheridan DJ: Arrhythmias and electrophysiological changes during myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 1983, 17: - 363-372.
 105. Bagdonas AA, Stuckey JH, Piera J et al: Effects of ischemia and hypoxia on the specialized conducting system of the canine heart. *Am. Heart J.* 1961, 61:206
 106. Opie LH, Nathan D, Lubbe WF: Biochemical aspects of arrhythmogenesis -- and ventricular fibrillation. *Am. J. Cardiol.* 1979, 42:131.148.
 107. Opie LH: Role of cyclic nucleotides in heart metabolism. *Cardiovasc. Res.* 1982, 16:483-507
 108. Khuri S, Flaherty JT, O'Riordan JB et al: Changes in intramyocardial -- ST segment voltage and gas tensions with regional myocardial ischemia. *Circ. Res.* 1975, 37:455-463.
 109. Case RB, Felix A, Castellano FA: Rate of rise of myocardial PCO_2 during

- early myocardial ischemia in the dog. *Circ. Res.* 1979, 45:324-330.
110. Corr PB, Gross RW, Sobel BE: Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ.Res.* 1984, 55:135-154.
 111. Corr PB, Sobel BE: The importance of metabolites in the genesis of ventricular dysrhythmia induced by ischemia. Biochemical factors. *Mod. Concepts Cardiovasc. Dis.* 1979, 48:49
 112. Downar E, Janse MJ, Durrer D: The effect of ischemic blood on transmembrane potential of normal porcine ventricular myocardium. *Circulation.* 1977, 55:45
 113. Sobel BE: Salient biochemical features in ischemic myocardium. *Circ.Res.* 1974, 35(suppl III):III-173
 114. Snyder DW, Crafford WA, Glashow JL, Rankin D et al: Lysophosphoglycerides in ischemic myocardium effluents and potentiation of their arrhythmogenic effects. *Am. J. Physiol.* 1981, 24:H700
 115. Lawrence AJ, Morres GR, Steele J: A conductimetric study of erythrocyte lysis by lysolecithin and linoleic acid. *Eur. J. Biochem.* 1974, 48:277
 116. Gerlings ED, Miller DT, Gilmore GP: Oxygen availability: a determinant of myocardial potassium balance. *Am. J. Physiol.* 1969, 216:559-562.
 117. Hill JL, Gettes LS: Effect of acute coronary occlusion on local myocardial extracellular potassium activity in swine. *Circulation.* 1980, 61:768
 118. Lubbe WF, Daries DS, Opie LH: Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated and perfused rat heart: a model for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. *Cardiovasc. Res.* 1978, 12:212-220.
 119. Cook NS: The pharmacology of potassium channels and their therapeutic -

- potential. Trends in Pharmacological Sciences. 1988, 9:21-28
120. Corr PB, Snyder DW, Cain ME et al: Electrophysiological effects of amphiphiles on canine Purkinje fibers. Implications for dysrhythmia secondary to ischemia. Circ. Res. 1981, 49:354
 121. Noble DJ: Initiation of the heart beat. Clarendon Press, Oxford. 1979 - 157
 122. Brown EB Jr, Miller F: Ventricular fibrillation following a rapid fall in alveolar carbon dioxide concentration. Am. J. Physiol. 1952, 169: -- 56-60
 123. Van Bogaert PP, Vereecke J, Camelier E: Cardiac pacemaker currents and extracellular pH. Arch. Int. Physiol. Biochim. 1975, 83:603
 124. Bourdillon PDV, Poole-Wilson PA: Effects of ischaemia and reperfusion - on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium. Cardiovasc. Res. 1981, 15:121
 125. Bing OHL, Keefe JF, Wolk MJ et al: Tension prolongation during recovery from myocardial hypoxia. J.Clin. Invest. 1971, 50:660
 126. Whalen DA, Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RB: Effect of transient period of ischemia on myocardial cells. Am. J. Pathol. 1974, 74:381
 127. Puri PS: Contractile and biochemical effects of coronary reperfusion -- after extended periods of coronary occlusion. Am. J. Cardiol. 1975, 36: 244
 128. Henderson AH, Lewis MJ, Housemans PR et al: Discrimination between hypoxic and reoxygenation contracture of heart muscle. J. Mol. Cell Cardiol. 1978, 10(suppl 34)
 129. Wojtczak J: Contracture and increased longitudinal resistance of cow - ventricular muscle induced by hypoxia. Circ. Res. 1979, 44:88-95

130. Wojtczak J: Influence of cyclic nucleotides on the internal longitudinal resistance and contractures in the normal and hypoxic mammalian cardiac muscle. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1982, 14:259-265
131. Chappell SP, Lewis MJ, Henderson AH: Myocardial reoxygenation damage: can it be circumvented? *Cardiovasc. Res.* 1985, 19:299-303
132. Beresewicz A, Kryńska EK: Effect of calmodulin antagonist on hypoxia and reoxygenation damage in isolated rabbit hearts. *Basic Res. Cardiol.* 1986 81:311-325
133. Hess ML, Okabe E, Kontos HA: Proton and free oxygen radical interaction with the calcium transport system of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1981, 13:767-772
134. Ramón JR: Physiopathological basis of Digitalis intoxication. In: Bayés A, Cosín J: *Diagnosis and Treatment of Cardiac Arrhythmias*. Pergamon — Press, Oxford, 1980, 667-680
135. Hayashi H, Ponnambalam C, Mc Donald TF: Arrhythmic activity in reoxygenated guinea pig papillary muscle and ventricular cells. *Circ. Res.* 1987 61(1):124-133
136. Liedtke AJ, Nellis S, Neely JR: Effects of excess free fatty acids on mechanical and metabolic function in normal and ischemic myocardium in swine. *Circ. Res.* 1978, 43:652
137. Corr PB, Cain ME, Witkowski FX et al: Potential arrhythmogenic electrophysiological derangements in canine Purkinje fibers induced by lysophosphoglycerides. *Circ. Res.* 1979, 44:822-832
138. Van der Vusse GJ, Roemen THM, Prinzen FW et al: Uptake and tissue content of fatty acids in dog myocardium under normoxic and ischemic conditions. *Circ. Res.* 1982, 50:538-546

139. Vassalle M, Greenspan K, Jomain S, Hoffman BF: Effects of potassium on automaticity and conduction of canine hearts. *Am.J. Physiol.* 1964, 207: 334-340
140. Arnsdorf MF, Sawicki GJ: The effects of lysophosphatidylcholine, a toxic metabolite of ischemia on the components of cardiac excitability in sheep Purkinje fibers. *Circ. Res.* 1981, 49:16-30
141. Sandermann H Jr: Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978, 515:209-237
142. Fong KL, McCay PB, Poyer JL et al: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 1973, 248:7792-7797
143. Sachs T, Moldown CF, Craddock PR, Bowers TK: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement stimulated granulocytes. *J. Clin. Invest.* 1978, 61:1161-1167
144. Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML: The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol. Scand.* 1980, (suppl I) 492:91-119
145. Lepran I, Nemezc G, Koltai M, Szekeres L: Effect of linoleic acid-rich diet on the acute phase of coronary occlusion in conscious rats: influence of indomethacin and aspirin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1981, 3:847-853
146. Sobel BE, Corr PB, Robison AK et al: Accumulation of lysophosphoglycerides with arrhythmogenic properties in the ischemic myocardium. *J. Clin. Invest.* 1978, 62:546-553
147. Corr PB, Witkowsky FX, Sobel BE: Mechanisms contributing to malignant dysrhythmias induced by ischemia in the cat. *J. Clin. Invest.* 1978, 61: 109-119

148. Lubbe WF, Podzuweit T, David PS, Opie LH: The role of cyclic adenosine - monophosphate adrenergic effects on ventricular vulnerability to fibrillation in the isolated perfused rat heart. *J. Clin. Invest.* 1978, 61: -- 1260
149. Podzuweit T, Dalby AJ, Cherry GW, Opie LH: Cyclic AMP levels in ischemic and non ischemic myocardium following coronary artery ligation: relation to ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1978, 10:81-94
150. Corr PB, Penkoske PB, Sobel BE: Adrenergic influences on arrhythmias due to coronary occlusion and reperfusion. *Br. Heart J.* 1978, 40(suppl):62-70
151. Carbonin P, di Gennaro M, Valle R, Weisz AM: Inhibitory effect of anoxia on reperfusion and Digitalis-induced ventricular tachyarrhythmias. *Am.-J. Physiol.* 1981, 240:H730-H737
152. Petropoulos P, Mijne NG: Cardiac function during perfusion of the circumflex coronary artery with venous blood, low molecular Dextran or Tyrode solution. *Am. Heart J.* 1964, 68:370-382
153. Langendorff O: Untersuchungen am uberlebenden saugtierherzen. *Pflügers Arch.* 1895, 61:291-332
154. Ramón JR, Lastra LA y cols: Estudio de la actividad eléctrica y contractil en corazón aislado de cobaya mediante una modificación de la técnica de Langendorff. *Rev. Esp. Cardiol.* 1979, 32:555-573
155. Reynolds JEF, Prasad AB: Martindale, The Extra Pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press, London, 1982. 1232,1452,1453,1735, 603,604,50-53
156. Van Gool S, Van Gool D, Ramón JR, Carmeliet E: Electrophysiological effects of hydrogen peroxide in single cardiac ventricular myocytes of the guinea-pig. *Arch.Int. Physiol. Biochim.* 1986, 94(2):43

157. Repine JE, Eaton JW, Anders MW et al: Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro. *J. Clin. Invest.* 1979 64:1642-1651
158. Gras J: Fundamentos de Bioquímica Médica. Ed.Toray, Barcelona, 1971, 17-25, 187-203
159. Del Maestro RF, Thaw HH, Björk J et al: Free radicals as mediators of - tissue injury. *Acta Physiol. Scand.* 1980, 492(suppl I):43
160. Van Der Heyden G, Vereecke J, Isenberg G, Callewaert G, Carmeliet E: Metabolic inhibition and the cardiac ventricular action potential: Voltage clamp analysis using single cells. *Arch. Int. Pharm. Thera.* 1983, - 263(2):331
161. De Lalla Jr V, Brown Jr HR: Normal respiratory variation of cycle length Q-T interval, and corrected Q-T interval of the electrocardiogram. *Am.-Heart J.* 1950, 39:519-522
162. Harvey Estes E: Electrocardiography and vectocardiography. In: Hurst JW, Logue RB, The Heart. McGraw-Hill, New-York, 1970, 301,302
163. Decourt LV, Serro Azul LG, Andrade e Silva U: Considerações sobre o intervalo QT. Estudo das fórmulas que estabelecem os valores normais. *J. - Bras.Med.* 1966, 10:12
164. Decourt LV: Considerações sobre o intervalo Q-T. Limites superiores da normalidade. *J. Bras. Med.* 1966, 10:21
165. Zipes DP: Genesis of cardiac arrhythmias. In: Braunwald E. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine. Saunders Company, Philadelphia, 1988, 705-708
166. Gardin JM, Singer DH: Atrial infarction. *Arch. Intern. Med.* 1981, 141: 1345-1348

167. Rochette L, Didier JP, Moreau D, Bralet J: Release of myocardial norepinephrine and ventricular arrhythmias following coronary reperfusion: effects of substrate and duration of the ischemic periods. *J. Mol. Cell - Cardiol.* 1979, 13(suppl II) (abstr):49
168. Sommers HM, Jennings RB: Ventricular fibrillation and myocardial necrosis after transient ischaemia. *Arch. Intern. Med.* 1972, 129:780-789
169. Murdock DK, Loeb JM, Ealer DE, Randall WC: Electrophysiology of coronary reperfusion. A mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation*, - 1980, 61:175-182
170. Thandroyen FT, McCarthy J, Burton KP, Opie LH: Ryanodine and Caffeine - prevent ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia and -- reperfusion in rat heart. *Circ. Res.* 1988, 62:306-314
171. Del Maestro RF: An approach to free radicals in medicine and biology. - *Acta Physiol. Scand.* 1980, (suppl), 492:153-168
172. Pallandi RT, Perry MA, Campbell TJ: Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded -- from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion induced arrhythmias. *Circ. Res.* 1987, 61:50-54
173. Cranefield PF, Aronson RS: Initiation of sustained rhythmic activity by single propagated action potentials in canine cardiac Purkinje fibers - exposed to sodium-free solution or to Ouabain. *Circ. Res.* 1974, 34:477-481
174. Gettes LS, Buchanan Jr JW, Saito T et al: Studies concerned with slow - conduction. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 81-87
175. Paes de Carvalho A: Slow and subliminal responses: their mechanism and

- relationship to other oscillatory phenomena in cardiac muscle. In: Zipes DP, Jalife J: Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 89-96
176. Naumann d'Alnoncourt C, Zierhut W, Lüderitz B: Clinical significance of late potentials. In: Pérez Gomez F: Cardiac Pacing. Madrid, Editorial - Grouz, 1985, 1353-1360
 177. Huey-Ming Lo, Braunwald E, Kloner RA: Intracoronary calcium blockade at the time of reperfusion. Circulation. 1984, (abstr), 70(suppl II)-260
 178. Menasché P, Grousset C, de Broccard G, Piwnica A: Protective effect of an asanguineous reperfusion solution on myocardial performance following cardioplegic arrest. Ann. Thorac. Surg. 1984, 37(3):222-228
 179. Clusin WT, Buchbinder M, Harrison DC: Calcium overload, injury current, and early ischaemic cardiac arrhythmias - a direct connection. Lancet, 1983, 17:272,273
 180. Sutko JL, Templeton L et al: Ryanodine - its alteration of cat papillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and a suggested mechanism of action. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1979:37--47
 181. Daly MJ, Elz JS, Nayler WG: Contracture and the calcium paradox in the rat heart. Circ. Res. 1987, 61:560-569
 182. Linden R: Function of cardiac receptors. Circulation. 1973, 48: 463--480
 183. Sharma AD, Saffitz JE, Lee BI, Sobel BE, Corr PB: Alpha adrenergic mediated accumulation of calcium in reperfused myocardium. J. Clin. Invest. 1983, 72:802-818
 184. Rao PS, Cohen MV, Mueller HS: Production of free radicals and lipid --

- peroxides in early experimental myocardial ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol* 1983, 15:713-716
185. Zipes DP, Barber MJ, Takahashi N, Gilmour Jr RF: Recent observations on autonomic innervation of the heart. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 181--189
 186. De Mello WC: Intercellular communication in cardiac muscle: physiological and pathologic implications. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 65-72
 187. Gilmour Jr RF, Evans JJ, Zipes DP: Preferential interruption of impulse transmission across Purkinje-muscle junctions by interventions that depress conduction. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 287-300
 188. Ferrier GR, Moffat MP, Lukas A, Mohabir R: A model of ischemia and reperfusion: Effect of potassium concentration on electrical and contractile responses of canine Purkinje tissue. In Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 325 - 330
 189. Antzelevitch C, Davidenko JM, Shen X, Moe GK: Reflected reentry: Electrophysiology and pharmacology. In: Zipes DP, Jalife J: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 253-264
 190. Dennis SC, Shattock MJ, Hearse DJ et al: Ventricular fibrillation: an association with two different metabolic responses to ischaemia. *Cardiovasc. Res.* 1983, 17:489-498
 191. Hearse DJ: Reperfusion of the ischaemic myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol* 1977, 9:605-616

192. Schlaffer M, Kane PF, Wiggins VY, Kirsh MM: Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. *Circulation*. 1982. 66(suppl I):85-92
193. Fujimoto T, Peter T, Hamamoto H, Mandel WJ: Electrophysiologic observations on ventricular tachyarrhythmias following reperfusion. *Am. Heart J.* 1983, 105:201-209
194. Gauduel Y, Duvelleroy M: Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1984, 16:459-470
195. Kuo CS, Pratap Reddy C, Munakata K, Surawicz B: Arrhythmias dependent - predominantly on dispersion of repolarization. In: Zipes DP, Jalife J:- *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Orlando, Grune and Stratton, 1985, 277-285
196. Pogwizd S, Corr PB: Electrophysiological mechanisms underlying arrhythmias due to reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*, 1987, 76 - (2):404-426
197. Braunwald E, Kloner RA: Myocardial reperfusion: a double edged sword ? *J. Clin. Invest.* 1985, 76:1713-1719
198. Chriske HW, Von Smekal P, Hilger HH: Enzyme patterns of human hearts in different types of coronary disease. *Intensivmedizin*. 1974, 11(6):370--375
199. Hearse DJ, Tosaki A: Reperfusion-induced arrhythmias and free radicals: studies in the rat heart with DMPO. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1987, 9 - (6):641-650
200. Ganote CE, Sims M, Safavi S: Effects of Dimethylsulfoxide (DMSO) on the oxygen paradox in perfused rat hearts. *Am. J. Pathol.* 1982, 109:270-276
201. Ganz V: The acute effect of alcohol on the circulation and on the meta-

- bolism of the heart. *Am. Heart J.* 1963, 494-497
202. Hearse DJ, Stewart DA, Bainbridge MV: Deleterious effects of Glucose and Mannitol infusion during ischaemic cardiac arrest. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1978, (abstr) 10(suppl 34)
 203. Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR: Free radicals and myocardial injury: pharmacologic implications. *Circulation.* 1986, 74(1):1-5
 204. Forman M, Puett DW, Bingham S et al: Preservation of endothelial cell - structure and function by intracoronary perfluorochemical in a canine - preparation of reperfusion. *Circulation.* 1987, 76(2):469-479
 205. Myers ML, Bolli R, Lekich RF et al: Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation.* 1985, 72(4):915-921
 206. Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB: Failure of Superoxide Dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation.* 1987, 75(6):1237-1248
 207. Reimer KA, Jennings RB: Failure of the xanthine oxidase inhibitor Allopurinol to limit infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. - *Circulation.* 1985, 71(5):1069-1075
 208. Snow JC et al: *Manual de anestesia.* Salvat Editores, Barcelona, 1981, 347-349
 209. Sodi-Pallares D, Bisteni A, Medrano GA, De Micheli A et al: The polarizing treatment in cardiovascular conditions. In: *Electrolytes and Cardiovascular diseases.* (Bajusz E, ed). Basel, Karger, 1966, 198-238